



**AUS DEM INSTITUT FÜR PATHOLOGIE  
DIREKTOR: PROF. DR. FERDINAND HOFSTÄDTER  
FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
UNIVERSITÄT REGENSBURG**

**DIE ROLLE DES  
KERATINOZYTENWACHSTUMSFAKTORS  
(KGF)  
IN FIBROSIERENDEN ERKRANKUNGEN  
DER HAUT**

**Inaugural - Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Biomedizinischen Wissenschaften**

**der Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg**

**vorgelegt von**

**Johanna Canady**

**2012**

Dekan:	Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert
Betreuerin:	Prof. Dr. Anja Boßerhoff
Tag der mündlichen Prüfung:	10.12.2012

## Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>1</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>3</b>
1.1 Die humane Haut und ihre häufigsten Zelltypen.....	3
1.1.1 Aufbau und Funktion der Haut.....	3
1.1.2 Charakterisierung und Funktion dermalen Fibroblasten.....	6
1.1.3 Epidermale Keratinozyten.....	7
1.2 Zell-Zell-Kommunikation .....	8
1.2.1 Generelle Mechanismen der Zell-Zell-Kommunikation.....	8
1.2.2 Arten der Signaltransduktion .....	9
1.2.3 Fibroblasten-Keratinozyten-Crosstalk.....	10
1.3 Der Keratinozytenwachstumsfaktor (KGF) .....	11
1.3.1 Charakterisierung und Expression von KGF .....	11
1.3.2 Der KGF-Signalweg.....	12
1.3.3 Die physiologische Bedeutung von KGF .....	13
1.4 Fibrosierende Erkrankungen der Haut.....	14
1.4.1 Keloid .....	14
1.4.2 Sklerodermie .....	15
1.4.3 Epithelial-mesenchymale Interaktionen in fibrosierenden Erkrankungen.....	19
<b>2 Zielsetzung.....</b>	<b>20</b>
<b>3 Ergebnisse.....</b>	<b>21</b>
3.1 KGF wird in Keloid und Sklerodermie verstärkt exprimiert .....	21
3.2 Die erhöhte KGF-Expression aktiviert Fibroblasten auf doppelt-parakrine Weise.....	24
3.3 Die Fibroblasten-Aktivierung wird durch KGF induzierte OSM-Sekretion von Keratinozyten vermittelt .....	29
3.4 OSM löst in Fibroblasten die Phosphorylierung von STAT3 aus.....	35
3.5 Die KGF- OSM-induzierte STAT3-Aktivierung ist wesentlich für die Fibrogenese.....	39
3.6 Die Behandlung humaner Haut mit rekombinantem KGF führt zur Expression von Fibrosemarkern .....	43
<b>4 Diskussion.....</b>	<b>45</b>
4.1 Die Bedeutung von KGF in fibrotischen Erkrankungen der Haut .....	45
4.2 Der Einfluss von OSM auf die kutane Fibrogenese.....	47
4.3 Der Beitrag des STAT3-Signalwegs zur Entstehung von Fibrose .....	48

4.4	Die Rolle des Urokinase-Plasminogen-Aktivatorsystems in fibrosierenden Hauterkrankungen .....	49
4.5	Bedeutung der KGF-OSM-induzierten Fibroblasten-Aktivierung .....	50
<b>5</b>	<b>Materialien und Methoden .....</b>	<b>53</b>
5.1	Materialien.....	53
5.1.1	Allgemeine Materialien.....	53
5.1.2	Geräte .....	55
5.1.3	Bakterien .....	57
5.1.4	Vektoren.....	57
5.1.5	Primäre Zellen.....	57
5.1.6	Humane Gewebeproben.....	58
5.1.7	Antikörper.....	58
5.1.8	Rekombinante Proteine und Inhibitoren .....	59
5.1.9	Oligonukleotide.....	59
5.1.10	Small interfering RNAs.....	59
5.1.11	Medien.....	60
5.1.12	Puffer und Lösungen.....	60
5.2	Methoden .....	62
5.2.1	DNA-Analytik .....	62
5.2.2	Klonierungen des KGF-Expressionskonstrukts.....	63
5.2.3	RNA-Analytik.....	65
5.2.4	Protein-Analytik .....	66
5.2.5	Zellkultur-Methoden .....	68
5.2.6	Statistische Auswertung .....	70
<b>6</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>72</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>75</b>
<b>8</b>	<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>83</b>
<b>9</b>	<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>85</b>
	<b>Eigene Publikationen .....</b>	<b>86</b>
	<b>Danksagung .....</b>	<b>87</b>
	<b>Erklärung .....</b>	<b>88</b>

## **Zusammenfassung**

Fibrosierende Erkrankungen der Haut sind durch eine Aktivierung der Fibroblasten charakterisiert, welche sich durch eine erhöhte Produktion und Ablagerung von extrazellulärer Matrix (EZM) auszeichnet. Das Spektrum der klinischen Erscheinungsformen ist breit und erstreckt sich von einem milden Verlauf mit nur lokal betroffenen Hautstellen bis hin zu lebensbedrohlichen Erkrankungen. Die molekulare Ursache für die Fibroblasten-Aktivierung ist bisher immer noch weitgehend unbekannt. Allerdings wird epithelial-mesenchymalen-Wechselwirkungen in der Fibroseforschung immer mehr Aufmerksamkeit geschenkt.

Gegenstand dieser Dissertation war die Untersuchung der Expression und Funktion des Keratinozytenwachstumsfaktors (KGF) in fibrosierenden Erkrankungen der Haut und dabei exemplarisch in Keloid und Sklerodermie. Im Vergleich zu gesunden Kontrollen erwies sich die Expression von KGF, einem Schlüsselmolekül der Fibroblasten-Keratinozyten-Kommunikation, in Fibroblasten und Hautgewebe von Keloid- und Sklerodermie-Patienten deutlich erhöht. Eingehende Analysen ergaben, dass diese Überexpression von KGF über einen doppel-parakrinen Wirkmechanismus die Aktivierung von dermalen Fibroblasten induziert. Wir konnten zeigen, dass Keratinozyten auf die Stimulation mit KGF reagieren, indem sie das pleiotropische Zytokin Oncostatin M (OSM) produzieren und sekretieren. Die Fibroblasten wiederum werden durch OSM aktiviert und reagieren dabei mit erhöhter Expression von Kollagen Typ I, FAP (Fibroblast Activation Protein) und mit verstärktem Migrationsverhalten. Es konnte gezeigt werden, dass OSM in Fibroblasten die Phosphorylierung von STAT3 induziert und dass die Aktivierung dieses Signalwegs essentiell für die verstärkte Kollagen-Synthese und Migration ist. Zudem konnten wir beweisen, dass das STAT3-Zielgen Urokinase-Plasminogen-Aktivator (uPA) für die verstärkte Fibroblasten-Migration verantwortlich ist.

Diese Arbeit beschreibt zum ersten Mal eine erhöhte Expression von KGF in mesenchymalen Zellen fibrosierender Hauterkrankungen und die dadurch induzierte Aktivierung dermalen Fibroblasten. Es wird eine neue Kausalschleife vorgeschlagen, die zum Verständnis der Pathogenese fibrosierender Erkrankungen der Haut beiträgt und zudem eine Reihe potentieller Zielstrukturen für neue Therapiestrategien offenlegt.

## Summary

Fibrotic disorders of the skin share the characteristic feature of increased production and deposition of extracellular matrix components by activated fibroblasts. Their clinical course ranges from benign syndromes with localized cutaneous involvement, to systemic, life-threatening diseases. The molecular cause for fibroblast activation remains unknown, yet epithelial-mesenchymal interactions draw mounting attention in the research field of fibrogenesis.

The aim of this dissertation was the examination of the expression and function of the keratinocyte growth factor (KGF), in fibrosing disorders of the skin, exemplarily in keloid and scleroderma. We found the expression of KGF a crucial molecule in fibroblast-keratinocyte crosstalk to be increased in disease-derived fibroblasts and tissues compared to healthy controls. Extensive analyses revealed that this overexpression induces dermal fibroblast activation through a double paracrine mode of action. We could show that keratinocytes produced and secreted the pleiotropic cytokine OSM (Oncostatin M) upon KGF stimulation. Fibroblasts were in turn activated by OSM reacting with increased expression of collagen type I  $\alpha 1$ , fibroblast activation protein and enhanced migration. Moreover we could prove that OSM leads to STAT3 phosphorylation and that the activation of STAT3 signaling is crucial for the observed increase of collagen expression and fibroblast migration. Additionally we could demonstrate that the STAT3 target gene urokinase plasminogen activator is responsible for the enhanced fibroblast migration.

This thesis reveals the increased expression of KGF in the mesenchymal cells in fibrosing disorders of the skin its induction of dermal fibroblast activation. A new causative loop is proposed, which contributes to a better understanding of the pathogenesis of fibrosing disorders of the skin and beyond that a variety of potential target structures for new therapeutic strategies is disclosed.

# **1 Einleitung**

Im Rahmen dieser Arbeit wird die Aufklärung des doppelt-parakrinen Wirkmechanismus beschrieben, mit dem der Keratinozytenwachstumsfaktor (KGF) indirekt die Aktivierung von Fibroblasten in fibrosierenden Erkrankungen der Haut vermittelt.

## **1.1 Die humane Haut und ihre häufigsten Zelltypen**

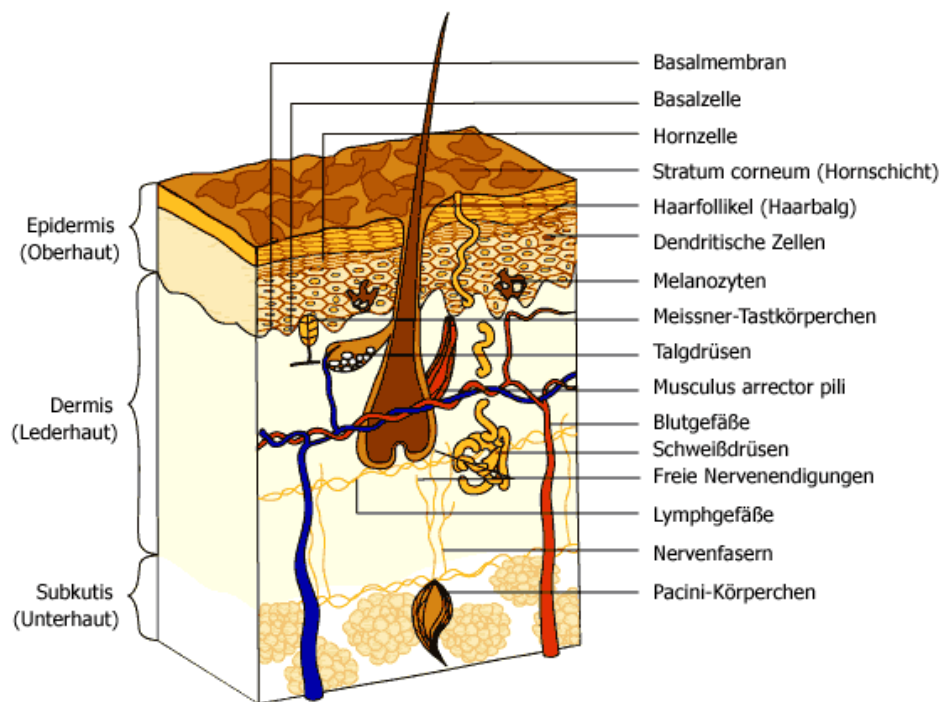
Zum besseren Verständnis wird an dieser Stelle zunächst ein Überblick über die beteiligten Zelltypen und deren Wechselwirkungen in der Haut gegeben.

### **1.1.1 Aufbau und Funktion der Haut**

Die menschliche Haut ist ein einzigartiges Organ, welches uns das Leben auf der Erde ermöglicht, indem es die Regulation der Körpertemperatur und des Wasserhaushalts gewährleistet und zudem den Körper vor dem Eindringen von Mikroorganismen und chemischen Noxen schützt. Als Sinnesorgan vermittelt sie mit ihren zahlreichen Rezeptoren Temperatur-, Druck- und Schmerzreize. Die Haut stellt mit einem Anteil von 10% am Körpergewicht und einer durchschnittlichen Fläche von 1,7 m<sup>2</sup> das größte Organ des menschlichen Körpers dar. Sie befindet sich in einem ständigen Regenerationsprozess, ist in der Lage passiv und aktiv auf äußere Angriffe zu reagieren und ist metabolisch aktiv. Der physiologische pH-Wert der Haut liegt bei 5,5 (Hwa et al., 2011).

Der Aufbau der Haut ist sehr komplex und ihre verschiedenen Schichten können auf unterschiedlichen Komplexitätsebenen betrachtet werden. Zum Verständnis dieser Arbeit ist eine Unterteilung in drei Schichten ausreichend, welche in Abbildung 1 schematisch dargestellt sind.





**Abbildung 1. Schematische Darstellung eines Querschnitts durch die humane Haut.**

(Quelle: dermis.net)

Den Übergang zwischen der Haut und den darunter liegenden Sehnen und Muskeln bildet die Hypodermis, welche als Stützgewebe dient. Darüber befindet sich die Dermis, welche durch eine Basalmembran mit der Epidermis, dem äußerste Kompartiment der Haut, fest verbunden ist.

**Die Subkutis.** Wie in Abbildung 1 zu sehen ist, stellt das subkutane Fettgewebe der Hypodermis ein Bindeglied zwischen der darüber liegenden Dermis und den darunter befindlichen Körperteilen dar. In den meisten Regionen des Körpers ist diese Schicht bis zu einigen Millimetern dick, mit Ausnahme von Hypodermis-freien Bereichen wie z.B. den Augenlidern. Diese Fettschicht dient zur Isolierung des Körpers und zum Schutz vor physikalischen Erschütterungen. Darüber hinaus gewährleistet die Hypodermis auch die Versorgung mit energiereichen Molekülen, da die größeren Blutgefäße und Nerven durch diese Schicht verlaufen. Der häufigste Zelltyp in der Hypodermis ist der Adipozyt. Zudem liegen hier Sinneszellen für starke Druckreize, die Vater-Pacini-Lamellenkörperchen (Yosipovitch et al., 2007).

**Die Dermis** oder auch Corium oder Lederhaut genannt, stellt mit 3-5 mm Dicke den größten Bestandteil der menschlichen Haut dar. Sie besteht aus einem Bindegewebs-Netzwerk, hauptsächlich aus stützenden Kollagen-Fasern und elastischem Gewebe zur Flexibilität, welches in ein Mukopolysaccharidgel eingebettet ist. Diese extrazelluläre Matrix wird vorwiegend von den

Fibroblasten, dem häufigsten dermalen Zelltyp, produziert. Die Komponenten dieses faserreichen Bindegewebes befinden sich permanent im Zustand des Umbaus und der Reorganisation. Die Dermis gliedert sich in zwei Schichten: das *Stratum papillare* und das *Stratum reticulare*. Das dichte Netzwerk aus Typ I und Typ III Kollagenen, welches mit wasserbindenden Glykosaminoglykanen, vor allem Hyaluronsäure und Dermatansulfat, ferner Chondroitin-4-sulfat und Chondroitin-6-sulfat angereichert ist, findet sich in beiden Schichten. Das *Stratum papillare* liegt direkt unterhalb der epidermalen Basalmembran und enthält die Kollagenfibrillen, welche die Dermis mit der Basalmembran verbinden. Des Weiteren ragen Bindegewebszapfen, die Papillen, in Vertiefungen der Epidermis, und vergrößern dadurch die Kontaktfläche zwischen Dermis und Epidermis. Diese Verankerung, so wie die Ernährung der Epidermis stellt eine der wichtigsten Aufgaben der Lederhaut dar. Daher sind zahlreiche Strukturen in die Dermis integriert, wie man in der Abbildung 1 deutlich erkennen kann: Gefäße des Blut- und des Lymphsystems, Nervenenden, Haarfollikel, sowie Talg- und Schweißdrüsen. Neben den Tastsinnesorganen wie den Meissnerschen Körperchen und den Thermorezeptoren befinden sich im *Stratum papillare* außerdem eine Vielfalt weißer Blutkörperchen wie Lymphozyten und Plasmazellen, so wie Monozyten, Makrophagen und Mastzellen. (Hwa et al., 2011).

Das *Stratum reticulare*, in welchem sich das subpapillare Gefäßnetz mit Arteriolen und Venolen befindet, ist maßgeblich an der Versorgung der Haut beteiligt. Die Arteriolen wachsen von hier aus zur Oberfläche und bilden Kapillarschlingen in den Papillen der Epidermis. Dadurch werden die Ernährung und der Stoffwechsel der gefäßlosen Epidermis ermöglicht. Zudem ist das *Stratum reticulare* reich an kräftigen Kollagenfaserbündeln vom Typ I, die der Bindegewebschicht die charakteristische Straffheit geben. Die Elastizität dieser Fasern gewährleistet auch die Rückordnung des Fasergeflechtes nach Dehnung der Haut. Ferner befinden sich in dieser Schicht die Ruffini-Körperchen, welche Wärmeempfindungen vermitteln. Auch Haarfollikel und Talgdrüsen, deren Ausführungsgänge in die Epidermis münden, sind im *Stratum reticulare* lokalisiert.

**Die Epidermis** ist ein hochkomplexes, verhorntes und gefäßloses Plattenepithel und bildet die äußerste Schicht des Körpers. Ihre Dicke variiert stark je nach Körperregion. An den Augenlidern ist sie nur zwischen 0,03-0,06 mm dick, während sie an stark belasteten Stellen wie den Handflächen und Fußsohlen einen Durchmesser von mehreren Millimetern haben kann. Die Epidermis wird nicht von Blutgefäßen durchzogen. Daher müssen sowohl Nährstoffe als auch Abfallprodukte per Diffusion die dermal-epidermale Grenze überschreiten, um die Gewebeintegrität zu erhalten. Die Epidermis kann nochmal in vier, sehr dynamische Schichten unterteilt werden: die an die Dermis angrenzende Basalzellschicht (*Stratum basale*), gefolgt von der Stachelzellschicht (*Stratum spinosum*), der Körnerzellschicht (*Stratum granulosum*) und zuletzt der

Hornschicht (*Stratum corneum*). Die Hornschicht besteht aus abgestorbenen, verhornten, kernlosen Zellen, welche zeitlebens ständig erneuert werden. Das *Stratum corneum* dient der Haut zum einen als Barriere gegen Fremdstoffe und schädliche Mikroorganismen von außen und schützt zudem vor Wasserverlust. Die komplexe Schichtung der 10-15µm dünnen Hornschicht kommt durch einen sehr geordneten Differenzierungsprozess der Keratinozyten zustande. Die Zellneubildung geht von Stammzellen aus und Aufbau und Reifung der Zellen unterliegen vielen äußeren und inneren Einflüssen (Madison, 2003; Sotiropoulou and Blanpain, 2012).

In der Epidermis kommen hauptsächlich vier Zelltypen vor. Die Keratinozyten stellen mit bis zu 90% die größte Gruppe dar. Sie werden in der Basalzellschicht gebildet und wandern allmählich von dort nach außen. Melanozyten machen nur 8 % der Epidermis aus. Sie produzieren das Pigment Melanin, welches die Hautfarbe bestimmt und vor schädlichem UV-Licht schützt. Weitere seltene Zelltypen sind die Langerhans-Zellen, die sich an der Immunantwort gegen Mikroorganismen beteiligen und die Merkel-Zellen, die als Druckrezeptoren fungieren (Hwa et al., 2011).

Alle drei beschriebenen Schichten der Haut stehen miteinander in Wechselwirkung, sind voneinander abhängig und beeinflussen sich gegenseitig. Die beiden häufigsten kutanen Zelltypen, welche für die Kommunikation zwischen den Hautschichten essentiell sind und im Fokus dieser Arbeit stehen, sind die dermalen Fibroblasten und die epidermalen Keratinozyten.

### **1.1.2 Charakterisierung und Funktion dermalen Fibroblasten**

Fibroblasten sind eine heterogene Zellpopulation mesenchymalen Ursprungs, die mannigfaltige Phänotypen aufzeigen und in einer Vielzahl von Geweben vorkommen. Die spindelförmigen dermalen Fibroblasten sind ein essentieller Bestandteil der Haut, da sie sich durch eine hohe Synthesekapazität auszeichnen und maßgeblich zur Neusynthese der dermalen Komponenten beitragen. Die bedeutendsten Syntheseprodukte sind die Strukturproteine Kollagen, Elastin, Fibronectin und Laminin sowie weitere Bestandteile der extrazellulären Matrix (EZM) wie Glukosamin- und Proteoglykane. Sie produzieren nicht nur EZM, sondern organisieren diese auch. Durch Expression von Metall-Ionen-abhängigen Matrixmetalloproteasen (MMPs) sind die Fibroblasten auch für den Abbau der EZM verantwortlich. Indem sie durch Regulation des Auf- und Abbaus der EZM die Homöostase aufrechterhalten, nehmen sie eine Schlüsselrolle in der Physiologie der Haut ein. Dabei stehen sie auch in ständiger Kommunikation miteinander und mit anderen Zelltypen. Folglich produzieren die dermalen Fibroblasten nicht nur unlösliche Matrixbestandteile, sondern auch lösliche Faktoren zur Zell-Zell- und zur Zell-Matrix-Kommunikation. Die Bedeutung der Fibroblasten wird besonders während der Wundheilung

deutlich. Nach einer Verletzung wird der Heilungsprozess durch die Bildung eines Thrombus eingeleitet, der durch Aggregation von Thrombozyten entsteht. Im Anschluss an die Blutgerinnungskaskade mit einhergehender Vasokonstriktion zum Stoppen der Blutung, kann die Wundheilung kategorisch in drei Phasen eingeteilt werden. Als erstes kommt die inflammatorische Phase, während der eine Vielzahl an Chemo- und Zytokinen sekretiert werden, die Granulozyten und später Makrophagen anlocken. Diese Immunzellen phagozytieren die Debris, sowie Krankheitserreger und beschädigtes Gewebe, wodurch sie Infektionen entgegen wirken. Außerdem geben sie weitere Faktoren ab, welche die proliferative Phase der Wundheilung einleiten, in welcher die dermalen Fibroblasten von essentieller Bedeutung sind. Zwei bis drei Tage nach der Verwundung beginnt die proliferative Phase, die durch mehrere sich überschneidende Schritte gekennzeichnet ist. Gleichzeitig mit der erhöhten Fibroblasten-Proliferation wandern Endothelzellen ein und es kommt zur Neoangiogenese. Die Fibroblasten, die im Wundbereich akkumulieren, beginnen zur Ersetzung des Thrombus mit der Synthese neuer provisorischer extrazellulärer Matrix, welche sich allerdings von der EZM in unverletztem Gewebe unterscheidet (Profyris et al., 2012). Außerdem muss das neu gebildete Bindegewebe während der Regenerationsphase von den Fibroblasten kontrahiert werden, um die Wundränder zusammenzuziehen (Coulombe, 2003).

### **1.1.3 Epidermale Keratinozyten**

Ausgehend vom proliferativ aktiven *Stratum basale* durchläuft der Keratinozyt im Zuge seiner Differenzierung die einzelnen Schichten der Epidermis, bis er schließlich als kernloser und keratinreicher Korneozyt in der äußersten Schicht, dem *Stratum corneum*, endet. Keratinozyten bestehen hauptsächlich aus Keratin und Keratohyalin (Filaggrin), einem histidinreichen interfilamentöses Matrixprotein (Hwa et al., 2011). Die Keratinozyten der Epidermis produzieren das Keratin, welches die Haut und die darunter liegenden Gewebe vor Hitze, Mikroben und Chemikalien schützt. Außerdem tragen die Keratinozyten ab dem *Stratum spinosum* sekretorische Organellen in sich, welche auch als Lamellarkörperchen bezeichnet werden und Phospholipide, Cholesterin und Glukosylceramide enthalten. Die Organellen tragen zum Verdunstungsschutz bei. Die abgestorbenen Epidermiszellen bilden folglich die äußere Oberfläche und den Fett- und Säuremantel der menschlichen Haut (Proksch et al., 2008).

Während der Regenerationsphase der kutanen Wundheilung sind die epidermalen Keratinozyten maßgeblich, um eine kutane Wunde wieder zu schließen. Durch eine Kombination aus verstärkter Migration, Proliferation und einer verminderten interzellulären Adhäsion der

Keratinocyten am Wundrand kommt es schließlich zu Reepithelialisierung der verletzten Hautstelle (Coulombe, 2003).

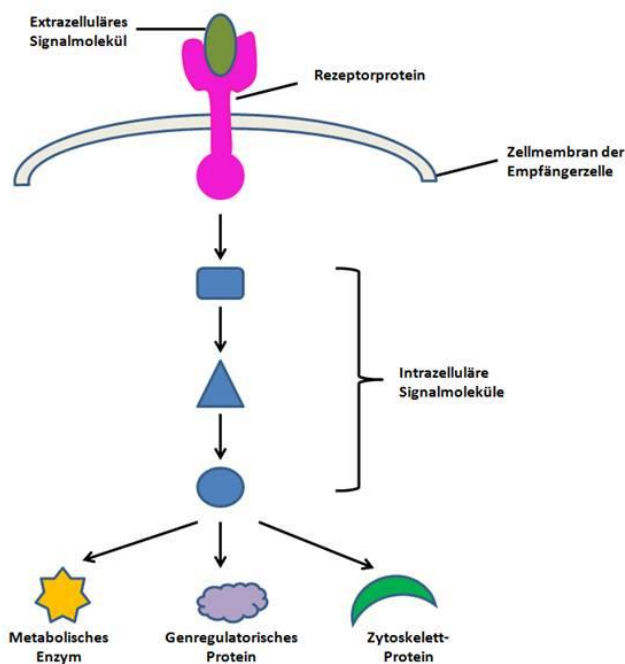
## **1.2 Zell-Zell-Kommunikation**

Der menschliche Körper befindet sich ständig im dynamischen Zustand der Regeneration. Das Nachwachsen von Haaren und Nägeln, die Erneuerung von Epithelien der Haut und die Heilung von Wunden: all diese Prozesse erfordern eine präzise Regulation. Das Verhalten der beteiligten Zelltypen wird sowohl durch zellautonome Mechanismen als auch durch hochkomplexe inter- und intrazelluläre Wechselwirkungen beeinflusst. Neben direkten Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen spielt auch die Kommunikation über Zytokine und Wachstumsfaktoren eine entscheidende Rolle (Eckes et al., 2000; Werner und Grose, 2003). Hochkomplexe intrazelluläre Mechanismen sind nötig, um zu kontrollieren, welches Signal, zu welchem Zeitpunkt und in welcher Intensität abgegeben wird, damit die Zelle, für die das Signal bestimmt ist, die Möglichkeit hat, dieses zu empfangen und korrekt zu interpretieren. Manche Signale wirken über weite Strecken, andere auf die benachbarten Zellen und wieder andere wirken direkt auf die Zelle, welche das Signal selbst ausgesendet hat. Die meisten Zellen im menschlichen Körper können sowohl Signale aussenden, als auch Signale empfangen.

### **1.2.1 Generelle Mechanismen der Zell-Zell-Kommunikation**

Die Kommunikation zwischen Zellen wird hauptsächlich durch extrazelluläre Signalmoleküle vermittelt. Für den Empfang eines solchen Signalmoleküls werden Rezeptor-Proteine benötigt, welche häufig an der Zelloberfläche lokalisiert sind. Inzwischen kennt man hunderte von Signalmolekülen. Dazu gehören Proteine, Peptide, Aminosäuren, Steroide, Retinoide, Fettsäurederivate und auch Gase, wie Stickstoffoxid oder Kohlenmonoxid. Die meisten Signalmoleküle sind hydrophil und deshalb nicht in der Lage die hydrophobe Zellmembran zu passieren. Es gibt aber auch einige relativ kleine Signalmoleküle, die oftmals hydrophob sind und durch die Zellmembran hindurch diffundieren können. Klassifiziert man die Signalmoleküle über ihre Funktion, dann gehören Hormone, Wachstumsfaktoren, Komponenten der extrazellulären Matrix, Zytokine, Chemokine, Neurotransmitter und Neurotrophine dazu. Außerdem lösen auch Umweltreize, wie Licht, Düfte, Temperaturreize oder mechanische Reize, wie z. B. Druck, Signalprozesse aus. Das Binden eines Signalmoleküls an seinen Rezeptor führt zu dessen Aktivierung, was wiederum die Aktivierung eines oder mehrerer intrazellulärer Signalwege induziert. Die Moleküle dieser Signal-Übertragungskette setzen sich hauptsächlich aus intrazellulären Signalproteinen zusammen. In Abbildung 2 ist stark vereinfacht dargestellt, wie

durch diese Signalkaskade das Signal ins Innere der Empfängerzelle und dort zu den entsprechenden intrazellulären Zielstrukturen weitergeleitet wird. Abhängig vom Signal, der Beschaffenheit und dem Zustand der Empfängerzelle können genregulatorische Proteine, Ionen-Kanäle, metabolische Enzyme oder Komponenten des Zytoskeletts als Effektoren fungieren. Diese Effektoren vermitteln wiederum eine der mannigfaltigen Zellantworten auf das Signal wie zum Beispiel eine Veränderung der Genexpression oder des Zellstoffwechsels oder auch eine Modifizierung der Zellbewegung bzw. der Zellform (Schlessinger, 2000; Scott and Pawson, 2000; Gadina et al., 2001; Alberts et al., 2008).



**Abbildung 2. Schematische Darstellung des generellen Prinzips der Signaltransduktion.**

Üblicherweise bindet ein extrazelluläres Signalmolekül an einen Rezeptor in der Zellmembran der Empfängerzelle. Dadurch wird ein intrazellulärer Signalweg induziert, der das Signal über mehrere intrazelluläre Signalmoleküle weiterleitet. Schließlich kommt es zur Aktivierung von Effektorproteinen, welche sich auf das Verhalten der Empfängerzelle auswirken. (eigene Darstellung in Anlehnung an Abbildung 15-1 aus Bruce Alberts, Molecular Biology of the Cell, 5th Edition)

### 1.2.2 Arten der Signaltransduktion

Extrazelluläre Signale können über kurze oder große Distanzen wirken. Man unterscheidet im Allgemeinen zwischen vier Arten der interzellulären Signalweiterleitung. Die **endokrine** Signalleitung bezeichnet die Weiterleitung eines Signals über den Blutweg, bei der eine weiträumige Verteilung des Signals über den ganzen Organismus möglich ist. Die Sekretion von Hormonen durch endokrine Zellen gehört in diese Gruppe der endokrinen Signalweiterleitung. Die zweite Form der Signalweiterleitung ist die **synaptische** Signalleitung der Neuronen. Hierbei

wird das Signal als elektrisches Signal entlang des Zellfortsatzes der Nervenzellen zu den Zielzellen transportiert. Die **kontaktabhängige** Signalleitung kann zwischen Zellen stattfinden, welche in unmittelbarem Kontakt zueinander stehen. Bei dieser Form der Signaltransduktion sind sowohl der Rezeptor als auch das Signalmolekül membrangebunden. Die vierte Form der Signalweiterleitung ist die **parakrine** Signalübertragung und steht im Fokus dieser Arbeit. Bei dieser Form werden die Signale durch Diffusion im Interzellularraum verbreitet (Zimmerman et al., 1993; Papin et al., 2005; Alberts et al., 2008). Häufig sind die Zellen, welche das Signal aussenden und die Empfängerzellen unterschiedliche Zelltypen. Manche Zellen sekretieren jedoch Signale, auf die sie selbst reagieren. Diese besondere Form der parakrinen Weiterleitung nennt man **autokrine** Signaltransduktion. Krebszellen nutzen diesen Weg der Signalübertragung, um sich selbst zu aktivieren und dadurch ihre Proliferations- und Überlebensrate zu stimulieren (Nicolson, 1993). Die Reichweite parakriner Signale ist lokal begrenzt. Sie diffundieren zu den benachbarten Zellen, wo sie an ihre jeweiligen Rezeptoren binden oder sie werden inaktiviert z.B. durch Abbau durch extrazelluläre Enzyme bzw. Immobilisierung durch die EZM (Singh and Harris, 2005; Alberts et al., 2008).

### 1.2.3 Fibroblasten-Keratinozyten-Crosstalk

Fibroblasten und Keratinozyten sind beide Zelltypen, die sowohl in der Lage sind Signale auszusenden als auch Signale zu empfangen. Einerseits können sie Zytokine und Wachstumsfaktoren sekretieren, gleichzeitig haben sie in ihrer Zellmembran auch eine Reihe an Rezeptoren, um selbst auf parakrine Reize zu reagieren. Epithelial-mesenchymale Interaktionen sind von großer Bedeutung für die Wundheilung, für die embryonale und postnatale Entwicklung der Haut und die Tumorbilogie. Während der Embryonalentwicklung kontrollieren streng regulierte Wechselwirkungen zwischen der Epidermis und dem Mesenchym die Ausbildung der Gliedmaßen und den Aufbau der Haut und ihrer Anhänge. Doch auch für die Aufrechterhaltung der Homöostase in der adulten Haut ist die Kommunikation zwischen dermalen Fibroblasten und epidermalen Keratinozyten essentiell (Tickle, 2006; Werner et al., 2007). Die Kommunikationsmöglichkeiten zwischen Fibroblasten und Keratinozyten sind vielfältig. Moderne experimentelle Ansätze mit Keratinozyten-Fibroblasten-Kokulturen zeigten deutlich, dass die Interaktionen sehr komplex sind. Beispielsweise können Keratinozyten durch Sekretion von IL-1 in Fibroblasten die Synthese und Abgabe von Zytokinen und Wachstumsfaktoren wie zum Beispiel KGF, IL-6 und GM-CSF zu induzieren. Diese Faktoren wirken sich wiederum auf die Proliferation und Differenzierung der Keratinozyten aus (Maas-Szabowski et al., 1999). Diese Beobachtungen zeigen, dass die Einflussnahme von Zellen aufeinander nicht immer

unidirektional ist, sondern wechselseitig. Das Konzept der doppelt parakrinen Signalübertragung steht im Fokus dieser Arbeit.

### **1.3 Der Keratinozytenwachstumsfaktor (KGF)**

Fibroblasten und Keratinozyten sekretieren lösliche Faktoren und beeinflussen sich damit gegenseitig auf parakrine Weise. Der Keratinozytenwachstumsfaktor (Keratinocyte Growth Factor; KGF) ist ein Paradebeispiel für einen solchen Faktor (Werner et al., 2007).

#### **1.3.1 Charakterisierung und Expression von KGF**

KGF ist ein starkes, parakrin agierendes Mitogen, welches von mesenchymalen Zellen produziert wird und über eine Spleißvariante des FGFR2 spezifisch auf epitheliale Zellen wirkt. Zum ersten Mal wurde der Keratinozytenwachstumsfaktor 1989 beschrieben. Es wurde gezeigt, dass Lungenfibroblasten diesen Faktor exprimieren und dieser parakrin auf epitheliale Zellen wirkt (Finch et al., 1989). KGF gehört zur Familie der „Fibroblast Growth Factors“ (FGF) und wird daher auch FGF-7 genannt. Insgesamt weist die Familie 23 Mitglieder auf, FGF1-FGF23, welche an vier verschiedene Rezeptortypen binden FGFR1-FGFR4 (Itoh, 2007). Die FGF-Rezeptoren sind transmembrane Rezeptor-Tyrosin-Kinasen mit entweder zwei oder drei immunoglobulin-ähnlichen Domänen und einer stark sauren Region im extrazellulären Bereich. Die FGFs sind strukturell verwandte Polypeptid-Mitogene, deren biologische Effekte neben der Bindung an ihre jeweiligen Rezeptoren, auch durch Bindung an Heparin und das cysteinreiche, transmembrane FGF-Bindeprotein vermittelt werden. Die meisten FGFs weisen ein sehr breites mitogenes Spektrum auf. Sie sind in der Lage die Proliferation einer Vielzahl von Zellen meso-, ecto- und endodermalen Ursprungs zu beeinflussen. Zudem wurden neurotrophe und angiogene Wirkungsweisen *in vivo* nachgewiesen. Im Gegensatz dazu nimmt KGF innerhalb der FGFs durch seinen spezifischen Wirkmechanismus und sein selektives Bindungsverhalten an eine einzige Spleißvariante des FGFR2, eine Sonderrolle ein (Werner et al., 1994; Werner, 1998).

Das KGF-Protein liegt als Monomer vor und weist ein Molekulargewicht von 22,5 kDa und eine Länge von 194 Aminosäuren auf. Das KGF-Gen liegt auf dem langen Arm des Chromosoms 15 (15q21.2) und enthält 3 Exone. Das Gen zeichnet sich dadurch aus, dass ein Teil von ihm, der die Exone 2 und 3, das Intron dazwischen und ein Segment des 3' untranslatierten Bereichs enthält, mehrfach amplifiziert und über das humane Genom verteilt wurde. Mehrere humane Chromosomen weisen solche Amplifikate auf, welche sich von den meisten Pseudogenen unterscheiden, da sie transkriptionell aktiv und in verschiedenen Geweben unterschiedlich reguliert sind. Diese multiplen Kopien von KGF-verwandten Genen konnten auch in den

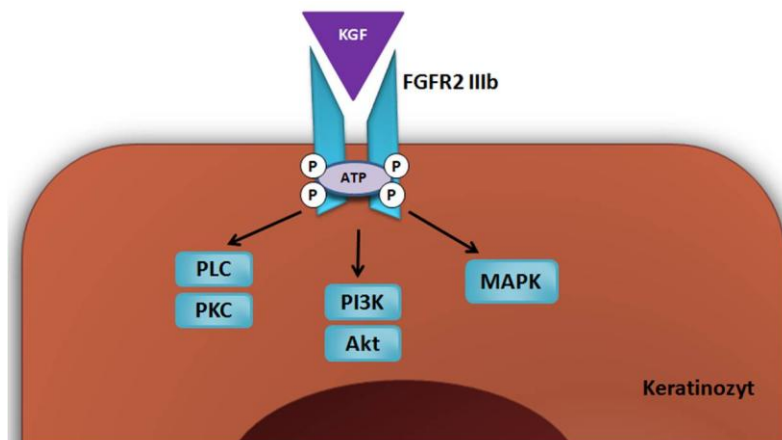


Genomen von Schimpansen und Gorillas nachgewiesen werden, jedoch nicht bei anderen Affenarten, Mäusen oder Hühnern (Zimonjic et al., 1997).

KGF wird hauptsächlich von mesenchymalen Zellen produziert und übt seine mitogene Wirkung auf eine Reihe epithelialer Zellen aus; neben epidermalen Keratinozyten auch auf die Epithelzellen der Lunge, der Leber, der Pankreasgänge sowie der Cornea (Steiling and Werner, 2003).

### 1.3.2 Der KGF-Signalweg

Eine Besonderheit von KGF ist, dass es nur an eine Spleißvariante des FGFR2 bindet. Diese Variante FGFR2 IIIb wird durch alternatives Spleißen der carboxyterminalen Hälfte der dritten immunglobulin-ähnlichen Domäne des FGFR2 generiert. Wie in der Abbildung 3 stark vereinfacht dargestellt ist, löst die Bindung von KGF an seinen Rezeptor dessen Homodimerisierung aus und ermöglicht die intermolekulare Autophosphorylierung der Rezeptormoleküle. Über die phosphorylierten Tyrosine werden Signaltransduktionskaskaden aktiviert, wie z.B. die Aktivierung der Phospholipase-C $\gamma$  (PLC $\gamma$ ) oder der Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK) (Boilly et al., 2000).



**Abbildung 3. Schematische Darstellung der KGF-Signaltransduktion.**

KGF bindet an die Spleißvariante IIIb des FGFR2, was die Homodimerisierung des Rezeptors und dessen Autophosphorylierung auslöst. Dadurch können mehrere Signalwege aktiviert werden einschließlich des PLC $\gamma$ /PKC/Ca<sup>2+</sup>-Signalwegs, PI3 kinase/Akt Signalwegs und des Ras/MAPK-Signalwegs(eigene Darstellung).

Die Expression von KGF wird durch eine Vielzahl von Zytokinen und Wachstumsfaktoren stimuliert. Insbesondere inflammatorische Zytokine wie IL-1 $\alpha$ , - $\beta$  und IL-6, die in der Haut im Verlauf der Wundheilung auftreten, regen die Freisetzung von KGF aus dermalen Fibroblasten stark an (Maas-Szabowski et al., 1999). Die Regulation der Expression von KGF kann dabei über

verschiedene Transkriptionsfaktoren erfolgen, z.B. Transkriptionsfaktoren der AP-1 (Activator Protein 1) -Familie (Florin et al., 2005).

### **1.3.3 Die physiologische Bedeutung von KGF**

Nach Verletzung eines Gewebes wird eine Kaskade von Ereignissen ausgelöst, die zur Gewebereparation dienen. Es wird eine ganze Reihe von parakrin bzw. autokrin wirkenden Zytokinen sezerniert, welche den Verlauf der Wundheilungsstadien koordinieren. KGF spielt dabei eine bedeutende Rolle. Bei epithelialen Reparaturprozessen und nach Verletzung der Haut steigt seine Expression in mesenchymalen Zellen um das 150-fache an (Finch et al., 1989). Interleukin-1 (IL-1), der Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) und PDGF (Platelet-derived growth factor) sind frühe Induktoren von KGF während der Wundheilung (Brauchle et al., 1994; Chedid et al., 1994). Nach einer Verletzung der Haut oder der Lunge beschleunigt die Applikation von KGF die Regeneration des Gewebes. Das Fehlen von KGF führt in KGF-Knockout-Mäusen allerdings nicht zu einer Verzögerung der Heilung inzisionaler Wunden, wohingegen die funktionelle Inaktivierung des FGFR2-IIIb in der Epidermis schwere Defekte in Homöostase und Regeneration der Haut nach sich zieht (Grose and Werner, 2004). Diese Diskrepanz ist höchstwahrscheinlich auf Redundanz zurückzuführen. Die strukturell sehr nahe verwandten Mitglieder der FGF-Familie FGF-10 und FGF-22 können die Funktion von KGF in der Wundheilung möglicherweise kompensieren (Werner et al., 2007). In basalen und suprabasalen Keratinozyten psoriatischer Läsionen, die durch eine hohe Proliferationsrate der Keratinozyten charakterisiert sind, ist der FGFR2-IIIb stark exprimiert, begleitet von einer erhöhten Expression von FGF-7 in den darunterliegenden dermalen Fibroblasten (Finch et al., 1989).

Rekombinantes humanes KGF, welches unter dem Markennamen Palifermin oder Kepivance<sup>®</sup> bekannt ist, ist eine modifizierte Version des natürlich vorkommenden KGF und wird in *Escherichia coli* produziert. Eine exogene Behandlung verletzter Haut mit Palifermin hat eine mitogen- und motogene Wirkung auf die heilende Epidermis. Neben der Erhöhung der Keratinozyten-Proliferation und -Migration vermittelt Palifermin bzw. KGF noch weitere Effekte. Indirekt wird die Angiogenese und die EZM-Ablagerung induziert. Darüber hinaus hat KGF auch noch starke zytoprotektive Eigenschaften, die vor allem nach Verletzung und unter anderen stressigen Bedingungen von Bedeutung sind. Es konnte gezeigt werden, dass KGF Epithelzellen vor dem Zelltod durch Bestrahlung, Chemotherapie und UV-Strahlung schützen kann. Die protektive Wirkung von KGF wird auf das Abfangen der durch diverse Noxen entstehenden schädlichen reaktiven Sauerstoffspezies (engl. Reactive oxygen species, ROS) erreicht (Madlener et al., 1996; Martin, 1997; Beaven and Shea, 2006; Grzegorzczuk-Jaźwińska et al., 2006).

## 1.4 Fibrosierende Erkrankungen der Haut

Die kutane Fibrose stellt einen sehr komplexen pathologischen Prozess dar, der durch eine Aktivierung von Fibroblasten und die Initiation verschiedener Kaskaden gekennzeichnet ist. Sie ist das Ergebnis übermäßiger Synthese und Deponierung extrazellulärer Matrix und ein Charakteristikum von fibrosierenden Bindegewbserkrankungen wie Keloid und Sklerodermie (Werner and Grose, 2003). Diese beiden Krankheiten wurden im Rahmen dieser Arbeit exemplarisch ausgewählt, um die Rolle von KGF in fibrosierenden Hauterkrankungen zu untersuchen und werden im Folgenden genauer beschrieben.

### 1.4.1 Keloid

Wundheilung in der Haut ist ein hochkomplexer Prozess, der das perfekte Zusammenspiel von Zellen der Epidermis, der Dermis und des Gefäß- und Immunsystems erfordert. Doch selbst wenn die Wundheilung ungestört abläuft, ist die Regenerationsfähigkeit erwachsener Menschen nach einer Verletzung nie perfekt. Die Bildung von Narbengewebe mit verminderter Funktionalität ist die Folge (Ferguson and O’Kane, 2004). Keloide stellen eine entartete, exzessive Form der Wundheilung dar, die bisher nur beim Menschen beschrieben wurde. Klinisch werden Keloide als wulstförmige und über den ursprünglichen Wundrand wuchernde Narben beschrieben (siehe Abbildung 4).



**Abbildung 4. Patient mit mehreren keloidalen Narben im Schulterbereich.**

(Quelle Prof. Dr. Sigrid Karrer, Institut für Dermatologie, Uniklinikum Regensburg)

Mit einer Inzidenzrate von 4-16%, sind Menschen mit dunkler Hautfarbe vor allem zwischen dem 10. und dem 30. Lebensalter am häufigsten betroffen. Da spontane Regression bei keloidalen Narben nur sehr selten vorkommt, stellen sie oft eine starke Verminderung der Lebensqualität für die Betroffenen dar. Neben den physischen Beschwerden wie Juckreiz und der manchmal auftretenden Einschränkung der Bewegungsfreiheit, sind Keloide durch die

ästhetische Beeinträchtigung vor allem eine starke psychische Belastung für die Patienten (Seifert und Mrowietz, 2009). Die Kollagenfasern in Keloiden sind größer und breiter als die in normalen Narben und sie kommen in dicken Bündeln vor. Das Verhältnis von Kollagen Typ I zu Typ III ist in keloidalen Narben stark erhöht (17:1) im Vergleich zu normalen Narben (6:1) (Verhaegen et al., 2009). Der gesamte Kollagen-Turnover in keloidalem Gewebe ist zugunsten der Kollagenproduktion und –akkumulation verändert, während der Kollagen-Abbau durch Matrix-Metalloproteasen vermindert ist (Ulrich et al., 2010).

Keloid-Fibroblasten unterscheiden sich von normalen Fibroblasten neben der erhöhten Kollagenproduktion auch noch in einigen weiteren Punkten. Die Expression einer Reihe von Molekülen, einschließlich Wachstumsfaktoren wie VEGF und Zytokinen wie IL-6 (siehe Tabelle 1), welche auch in der normalen Wundheilung eine Rolle spielen, ist in Keloid-Fibroblasten verändert (Shih et al., 2010). Sowohl ihre Proliferationsrate als auch ihre Resistenz gegen Apoptose ist im Gegensatz zu normalen Fibroblasten verstärkt (Seifert and Mrowietz, 2009).

Bisher gibt es keine Monotherapie, die Keloide effektiv heilen kann. Eine Vielzahl von Behandlungsoptionen wurde bereits angewendet unter anderem Kompressionstherapie, Okklusiv-Verbände, Steroid-Injektionen, Bestrahlung, Bleomycin- und Interferon-Therapie. Nachdem die profibrotische Rolle von TGF- $\beta$  bei der Keloid-Entstehung so wie bei anderen fibrosierenden Erkrankungen entdeckt wurde, wurden neue vielversprechende Anti-TGF- $\beta$ -Therapien entwickelt. Die ursächlichen Mechanismen, welche die Aktivierung der Fibroblasten auslösen, bleiben jedoch ungeklärt und die keloidalen Narben lassen sich nach wie vor nicht erfolgreich behandeln (Viera et al., 2010).

### **1.4.2 Sklerodermie**

Der Begriff Sklerodermie leitet sich aus den griechischen Wörtern für „hart“ (scleros) und „Haut“ (derma) ab und umschreibt eine ganze Gruppe seltener Erkrankungen, die mit einer Bindegewebsverhärtung einhergehen (Boin and Hummers, 2008).

#### **1.4.2.1 Systemische Sklerodermie**

Systemische Sklerodermie ist eine chronische multisystemische Autoimmunkrankheit. Da sie mit einer Inzidenz von 0,45-1,9/ 100.000 Individuen pro Jahr, je nach untersuchter Population, sehr selten vorkommt, wird sie zu den „orphan diseases“ gezählt. Die Gesamtsterblichkeit ist jedoch hoch und die 5-Jahres-Überlebensrate variiert zwischen 34-73%. Frauen sind 4-10 Mal häufiger betroffen als Männer. Die Krankheit tritt meist im frühen oder mittleren Erwachsenenalter auf. Auf Abbildung 5 ist eine Patientin mit systemischer Sklerose gezeigt.



**Abbildung 5. Patientin mit systemischer Sklerodermie.**

(Quelle Prof. Dr. Sigrid Karrer, Institut für Dermatologie, Uniklinikum Regensburg)

Drei pathologische Kennzeichen sind besonders charakteristisch für die systemische Sklerodermie: übermäßige Kollagenproduktion durch aktivierte Fibroblasten in der Haut und den inneren Organen, Mikroangiopathie durch strukturelle Schädigung der kleinen Blutgefäße und Defekte der humoralen und zellulären Immunantwort mit einhergehender Autoantikörper-Produktion.

Die Ätiologie der systemischen Sklerodermie ist immer noch größtenteils unbekannt. Eine Reihe von Faktoren legen jedoch eine genetische Disposition nahe: Weibliche Prädominanz, verstärktes Auftreten in Familien mit erhöhter Bildung von nukleären Antikörpern so wie in einigen ethnischen Gruppen, wie z.B. bei Choctaw Indianern und jungen schwarzen Frauen und darüber hinaus die Assoziation von Sklerodermie mit bestimmten HLA-Haplotypen.

Die Pathophysiologie der systemischen Sklerodermie äußert sich in inflammatorischen Prozessen mit verstärktem Auftreten von Typ I und Typ III Kollagen. Verglichen mit normalen Hautbiopsien sind die dermalen Kollagenbündel durch eine wachsartige stark fibrotische Matrix ersetzt. Außerdem ist auch vermehrt Hyaluron innerhalb der Epidermis und der Dermis abgelagert (Jinnin, 2010).

Die genaue Ursache für die verstärkte Aktivität der Fibroblasten ist nach wie vor nicht genau aufgeschlüsselt; es werden jedoch vielfältige Faktoren diskutiert (siehe Tabelle 1, S.18).

#### **1.4.2.2 Zirkumskripte Sklerodermie (Morphea)**

Zirkumskripte Sklerodermie umschreibt eine Gruppe seltener, chronischer, entzündlicher Krankheiten des kollagenösen Bindegewebes. Abgesehen von der Haut selbst sind auch an die Haut angrenzende Strukturen betroffen: Fettgewebe, Muskeln, Gelenke und selbst Knochen

können je nach Subtyp tangiert sein. Anders als bei der systemischen Sklerodermie sind die inneren Organe bei Patienten mit zirkumskripter Sklerodermie nicht beteiligt. Außerdem kann man Morphea von der systemischen Sklerodermie durch das Fehlen weiterer Symptome wie Akrosklerose, Sklerodaktylie, Raynaudphänomen und pathologischer Nagelfalzmikroskopie unterscheiden und zudem ist auch die Lebenserwartung nicht beeinträchtigt (Takehara and Sato, 2005; Fett and Werth, 2011). Abbildung 6 zeigt eine betroffene Frau.



**Abbildung 6. Patientin mit zirkumskripter Sklerodermie.**

(Quelle Prof. Dr. Sigrid Karrer, Institut für Dermatologie, Uniklinikum Regensburg)

Mit einer Inzidenzrate von 2,7/100.000 Individuen pro Jahr ist die zirkumskripte Sklerodermie ungefähr 2-3 Mal häufiger als die Systemische. Weiße sind öfter betroffen als dunkelhäutige Menschen und Frauen sind 2,6-6 Mal häufiger betroffen als Männer. Kinder und Heranwachsende sind die am stärksten betroffene Bevölkerungsgruppe (Leitenberger et al., 2009; Fett and Werth, 2011).

Der Terminus „zirkumskripte Sklerodermie“ umschreibt fünf Hauptformen: den Plaque-Typ, sowie die generalisierte, die bullöse, die lineare und die profunde Form der zirkumskripten Sklerodermie. Diese Formen können getrennt oder simultan auftreten und sind teilweise selbst noch in weitere Subtypen zu untergliedern. Der Plaque-Typ ist die häufigste Form der Erkrankung und ist charakterisiert durch stark sklerotische weißliche Läsionen. Diese Läsionen treten an mindestens zwei verschiedenen Lokalisationen auf und dabei sehr häufig am Rumpf. Aktiv fibrosierende Plaques sind oft von einem violetten Ring umgeben, dem sogenannten „lilac ring“ (Fett and Werth, 2011).

Die Fibrose und Sklerose, welche die zirkumskripte Sklerodermie auszeichnen, ist auch wieder auf eine übermäßige Expression von Kollagen Typ I und III durch aktivierte dermale Fibroblasten zurückzuführen. Die genaue Ursache der zirkumskripten Sklerodermie ist jedoch,

wie auch bei allen anderen fibrosierenden Erkrankungen der Haut, unbekannt. Es gibt allerdings eine Vielzahl von Faktoren, die mit dieser Krankheit assoziiert werden (siehe Tabelle 1). Einiges spricht für eine genetische Prädisposition (Tomimura et al., 2008; Kurzinski and Torok, 2011). In den Familien von Betroffenen treten Erkrankungen aus dem rheumatischen Formkreis vermehrt auf. Es finden sich außerdem auch bestimmte Autoantikörper mit verstärkter Häufigkeit (Takehara and Sato, 2005).

	<b>Keloid</b>	<b>Systemische Sklerodermie</b>	<b>Zirkumskripte Sklerodermie</b>
<b>Inzidenz</b>	häufig (6-16% bei Dunkelhäutigen) (Satish et al., 2006; Seifert and Mrowietz, 2009)	selten 0,45-1,9/ 100.000 (Medsgger, 1994)	selten 0,4-2,7/ 100.000 (Fett and Werth, 2011)
<b>Störungen des Kollagen-Abbaus</b>	Expression von MMP-2, TIMP-1 und -2 erhöht (Ulrich et al., 2010)	TIMP-1-Level erhöht, Inhibierende Autoantikörper gegen MMPs (Young-Min et al., 2001; Jinnin, 2010)	Inhibierende Autoantikörper gegen MMP-1 (Tomimura et al., 2008)
<b>HLA-Assoziation</b>	DRB15 (Brown et al., 2008)	DRB11, DBQ (Arnett et al., 2010)	keine Daten
<b>Zytokine und Wachstumsfaktoren</b>	TGF- $\beta$ , VEGF, CTGF, Activin, SCF, IL-6 (Seifert and Mrowietz, 2009)	TGF- $\beta$ , PDGF, CCL2, CTGF, IL-1,2,3,4,10 and 17 (Bhattacharyya et al., 2011)	TGF- $\beta$ , IL-2, 4, 6, 8, and 17 (Kurzinski and Torok, 2011)
<b>Profibrotischer Einfluss des gp130/STAT3-Signalwegs</b>	experimentell bestätigt (Lim et al., 2006; Ghazizadeh et al., 2007)	experimentell bestätigt (Khan et al., 2012)	experimentell bestätigt (Kurzinski and Torok, 2011)
<b>miRNA</b>	miR-196 ↓	miR-196 ↓ (Honda et al., 2012)	keine Daten

**Tabelle 1. Vergleich von Keloid und systemischer und zirkumskripten Sklerodermie.**

### **1.4.3 Epithelial-mesenchymale Interaktionen in fibrosierenden Erkrankungen**

Es ist bekannt, dass epithelial-mesenchymale Interaktionen von großer Bedeutung für die Homöostase der Haut sind (Werner et al., 2007). Da die exzessive Produktion von EZM-Komponenten, wie sie in fibrosierenden Bindegewebskrankheiten der Haut vorkommt, als extreme Form der Wundheilung verstanden werden kann, ist es naheliegend, dass auch bei diesen Erkrankungen die Kommunikation zwischen Fibroblasten und Keratinozyten ausschlaggebend ist. Es wurde gezeigt, dass Keratinozyten durch Stimulation mit TGF- $\beta$  die Differenzierung dermalen Fibroblasten zu Myofibroblasten, welche ein Kennzeichen für fibroproliferative Erkrankungen sind, induzieren können (Krieg et al., 2007). Außerdem wurde herausgefunden, dass Interaktionen zwischen Fibroblasten und Keratinozyten auch die MMP-Expression modulieren (Sawicki et al., 2005).

Es gibt zahlreiche Studien, die belegen, dass sowohl die Pathogenese von Keloiden als auch die der systemischen Sklerodermie unmittelbar von Wechselwirkungen zwischen Fibroblasten und Keratinozyten gefördert wird. Im Allgemeinen werden die Fibroblasten als der verantwortliche Zelltyp angesehen, da sie übermäßige Mengen an EZM-Komponenten exprimieren, welche die Fibrose ausmachen (Wynn, 2007; Huang and Ogawa, 2012). Es gibt aber auch Daten, die für eine Beteiligung der Keratinozyten sprechen. Bei der pulmonaren Fibrose tragen die Keratinozyten, zur Aktivierung der dermalen Fibroblasten bei (Selman and Pardo, 2002) und auch bei systemischer Sklerodermie wurden solche Ereignisse beschrieben (Aden et al., 2010). Eine Vielzahl von Arbeiten spricht dafür, dass sich die Aktivierung von Fibroblasten in verschiedenen proliferativen Erkrankungen am stärksten ausprägt, wenn sie mit Keratinozyten interagieren (Lim et al., 2002; Phan et al., 2002; Butler et al., 2008; Aden et al., 2010).



## 2 Zielsetzung

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Bedeutung epithelial-mesenchymaler Interaktionen bei der Pathogenese fibroproliferativer Krankheiten erforscht werden. Ein Hauptfaktor für die Kommunikation zwischen Fibroblasten und Keratinozyten ist der Keratinozytenwachstumsfaktor (KGF). KGF ist ein starkes, parakrin agierendes Mitogen, welches von mesenchymalen Zellen produziert wird und über eine Spleißvariante des FGFR2 spezifisch auf epitheliale Zellen wirkt. Vor diesem Hintergrund wurde der Expressionsstatus des Keratinozytenwachstumsfaktors (KGF) im Rahmen dieser Arbeit in fibrosierenden Erkrankungen der Haut untersucht, exemplarisch in Keloid und Sklerodermie. Die Identifikation einer verstärkten KGF-Expression in Keloid- und Sklerodermie-Fibroblasten war die Basis für die Fragestellungen dieser Dissertation.

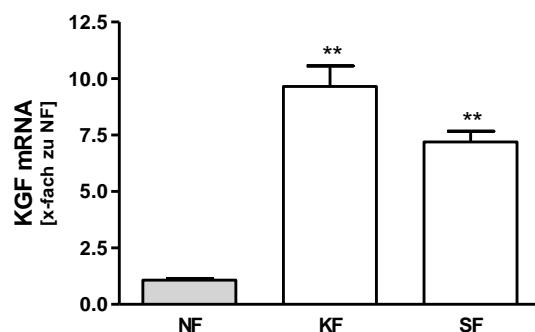
Zum einen galt es zu klären, ob die erhöhte KGF-Expression auch *in vivo* zu finden ist. Zum anderen wollten wir herausfinden, welche Auswirkungen diese Überexpression in fibrosierenden Erkrankungen der Haut haben könnte. Aufgrund der parakrinen Wirkungsweise von KGF wurde von Anfang an spekuliert, dass KGF indirekt, über die Keratinozyten Einfluss auf das Verhalten der Fibroblasten nehmen kann. Es sollte also untersucht werden, ob und auf welche Weise die Keratinozyten auf die erhöhte KGF-Expression reagieren. Ein erklärtes Ziel war die Identifikation eines oder mehrerer Faktoren, welche von den Keratinozyten in Abhängigkeit von KGF sekretiert werden und wodurch sie wiederum das Verhalten der Fibroblasten modifizieren. Diese potentielle doppelt-parakrine Feedback-Schleife, ihre Abläufe und Bestandteile, sollten im Verlauf der vorliegenden Arbeit aufgeklärt werden.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 KGF wird in Keloid und Sklerodermie verstärkt exprimiert

Aufgrund der immensen Bedeutung des Keratinozytenwachstumsfaktors (KGF) für mesenchymal-epitheliale Interaktionen und die Homöostase der Haut im Allgemeinen sollte dessen Expression in fibrosierenden Erkrankungen der Haut bestimmt werden. Der Fokus wurde dabei exemplarisch auf keloidale Narben und zirkumskripte Sklerodermie gelegt. Beiden Krankheitsbildern gemein ist eine Aktivierung der Fibroblasten, deren Ursprung bisher unbekannt ist. Allerdings geht man davon aus, dass pathologische Veränderungen in der Fibroblasten-Keratinozyten-Kommunikation, dabei eine wichtige Rolle spielen (Krieg et al., 2007).

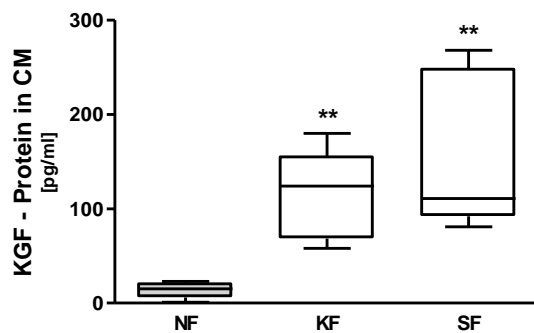
Zunächst wurde die mRNA Expression von KGF in Keloid- und Sklerodermie-Fibroblasten im Vergleich zu gesunden Fibroblasten mittels RT-PCR bestimmt. Bemerkenswerterweise war die Expression in allen Fibroblasten aus Patienten-Gewebe signifikant stärker als in normalen Fibroblasten (siehe Abbildung 7).



**Abbildung 7. KGF-mRNA Expression in Keloid- und Sklerodermie Fibroblasten im Vergleich zu normalen Fibroblasten.**

Die Expression von KGF wurde mittels RT-PCR analysiert. Im Vergleich zu normalen Fibroblasten (NF) (n=7) war die KGF-mRNA-Expression in Keloid-Fibroblasten (KF) (n=4) und Sklerodermie-Fibroblasten (SF) (n=5) signifikant erhöht.

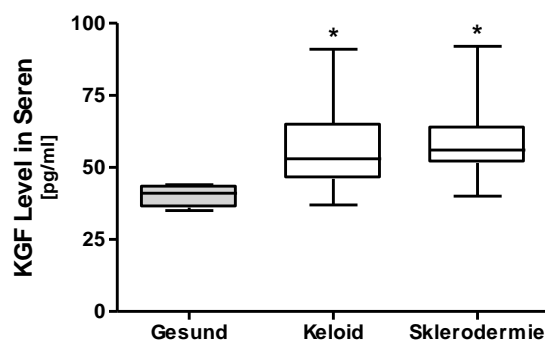
Dieses *in-vitro* Ergebnis ließ sich auch auf Protein-Ebene mit Hilfe eines KGF-ELISAs bestätigen. In den Überständen von Keloid- und Sklerodermie-Fibroblasten war 3-10 Mal mehr KGF Protein enthalten als in den Überständen von normalen Fibroblasten (siehe Abbildung 8).



**Abbildung 8. KGF-Protein-Konzentration in den Fibroblasten-Überständen.**

Die KGF-Konzentrationen in den Fibroblasten-Überständen wurden mittels KGF-ELISA bestimmt. In den Überständen von KF und SF waren die Mengen an KGF-Protein gegenüber denen von NF (alle  $n=5$ ) signifikant erhöht.

Zur Untersuchung der KGF-Expression *in vivo* wurde die KGF-Konzentration in Patienten-Seren bestimmt und erstaunlicherweise zeigten sich auch hier signifikant verstärkte Protein-Konzentrationen in den Seren von Keloid- und Sklerodermie-Patienten verglichen mit den Seren von gesunden Kontrollpersonen (siehe Abbildung 9). Eine Verdoppelung der KGF-Serumkonzentration ist besonders bemerkenswert, wenn man bedenkt, dass bei diesen Erkrankungen oft nur kleine Hautbereiche betroffen sind.

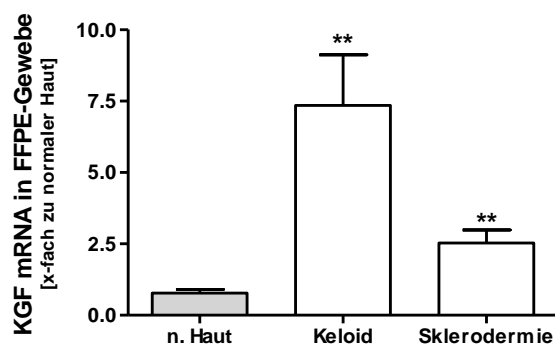


**Abbildung 9. KGF-Protein Mengen in den-Seren von Keloid- und Sklerodermie-Patienten im Vergleich zu gesunden Spendern.**

Mithilfe des KGF-ELISAs wurde die Serum-KGF-Konzentration gemessen. In den Seren von Keloid- ( $n=30$ ) und Sklerodermie-Patienten ( $n=20$ ) verglichen mit den Seren von gesunden Kontrollpersonen ( $n=10$ ) waren die KGF-Proteinmengen signifikant erhöht.

Zudem wurde der KGF-Expressionsstatus auch in Keloid- und Sklerodermie-Gewebe bestimmt. Dazu wurde RNA aus in Paraffin eingebettetem formalinfixierten Gewebe isoliert und mittels

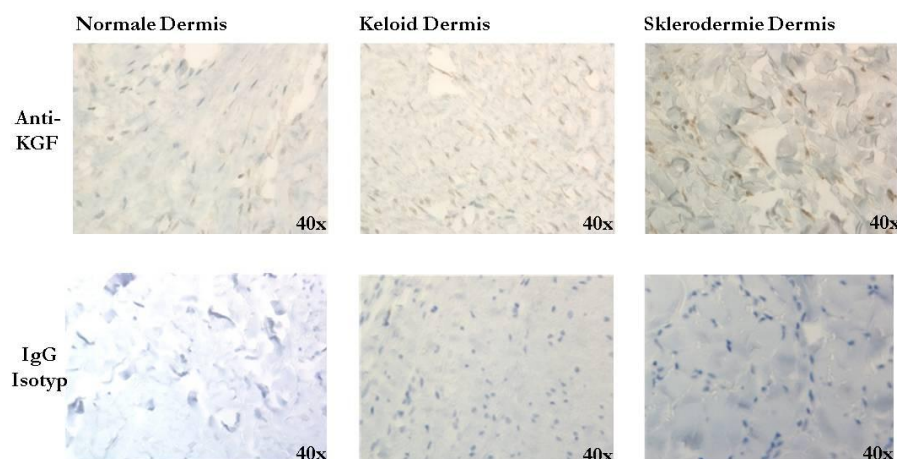
RT-PCR analysiert. Die Expression von KGF in erkranktem Gewebe war hierbei ebenfalls signifikant erhöht (siehe Abbildung 10).



**Abbildung 10. KGF-Expression in gesundem und erkranktem Gewebe.**

Die mRNA Expression von KGF in Formalin-fixiertem Paraffin (FFPE)-Gewebe von Keloid (n=5)- und Sklerodermie-Patienten (n=5) im Vergleich zu gesunden Spendern (n=6) erwies sich als signifikant erhöht.

Darüber hinaus wurde mittels Immunhistochemie gezeigt, dass in Keloid- und Sklerodermie-Gewebe KGF auch auf Protein-Ebene verstärkt exprimiert wird. Abbildung 11 zeigt jeweils einen exemplarischen Gewebeschnitt und die dazugehörige Isotyp-Kontrolle.

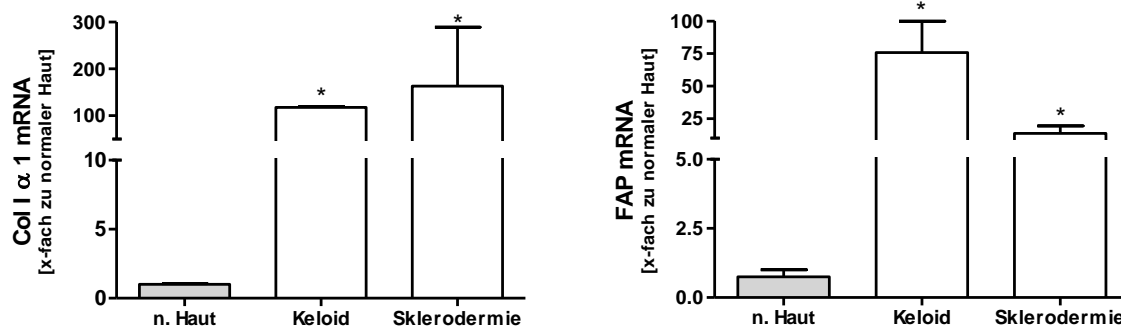


**Abbildung 11. KGF-IHC in normaler Dermis und Keloid- bzw. Sklerodermie-Dermis.**

Durch immunhistochemische Färbung mit einem KGF-Antikörper konnte die verstärkte KGF-Expression auch im Gewebe von Keloid- und Sklerodermie-Patienten im Vergleich zu gesunder Haut nachgewiesen werden.

### 3.2 Die erhöhte KGF-Expression aktiviert Fibroblasten auf doppelt-parakrine Weise

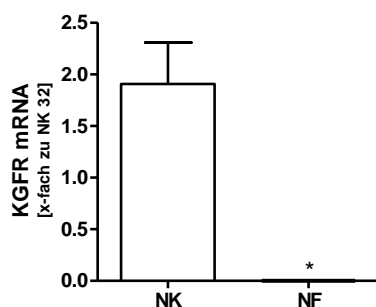
Zur Untersuchung der Frage ob und auf welche Weise die erhöhte KGF-Expression Einfluss auf die Fibroblasten-Aktivität nimmt, wurden zunächst zwei Marker zur Bestimmung des Fibroblasten-Aktivitätsstatus ausgewählt: Kollagen Typ I  $\alpha 1$  (ColI $\alpha 1$ ), welches von Keloid- und Sklerodermie-Fibroblasten verstärkt exprimiert wird und das „fibroblast activation protein alpha“ (FAP- $\alpha$ ), dessen Expression ebenfalls auf aktivierte Fibroblasten beschränkt ist (Dienus et al., 2010). Die Eignung der beiden Marker wurde auf mRNA Ebene bestätigt, wie man in Abbildung 12 erkennen kann. In beiden Fällen war die Expression in Patientengewebe im Vergleich zu normaler Haut signifikant erhöht.



**Abbildung 12. Kollagen Typ I  $\alpha 1$  und FAP mRNA Expression in FFPE-Gewebe.**

Mithilfe von RT-PCR wurde die Expression von den Fibrosemarkern Kollagen Typ I  $\alpha 1$  und FAP mRNA in gesundem und erkranktem Gewebe untersucht werden. Beide Marker werden in Keloid (n=4)- und Sklerodermie-Gewebe (n=3) deutlich stärker exprimiert als in normaler Haut (n=4).

KGF kann nicht direkt auf Fibroblasten wirken, da ihnen der KGF-Rezeptor fehlt (Miki et al., 1992), wie man in Abbildung 13 sehen kann.

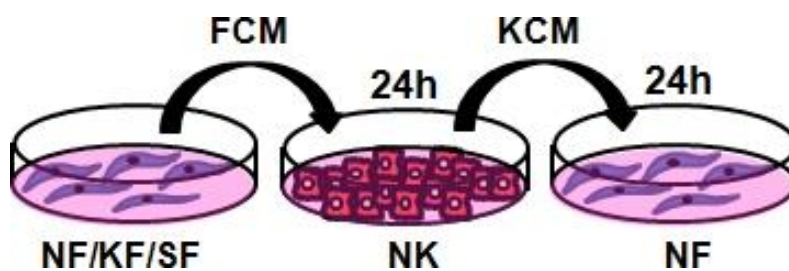


**Abbildung 13. Expression des KGF-Rezeptors.**

Mittels RT-PCR wurde die Expression des KGFR in Keratinozyten (NK; n=4) und Fibroblasten (NF; n=3) bestimmt. Auf diese Weise konnte bestätigt werden, dass Fibroblasten den KGFR nicht exprimieren.

Daher wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Keratinozyten auf den KGF-Stimulus mit der Sekretion eines oder mehrerer Faktoren reagieren, welche wiederum die Aktivierung der Fibroblasten zur Folge hat. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde ein Modell gewählt, welches der parakrinen Wirkungsweise des Keratinozytenwachstumsfaktors gerecht wird. Die Abbildung 14 zeigt eine schematische Darstellung des experimentellen Aufbaus.

Normale humane epidermale Keratinozyten (NK) wurden 24h mit den konditionierten Medien (CM) von normalen (NF), so wie von Keloid- (KF) und Sklerodermie-Fibroblasten (SF) behandelt. Im Anschluss wurden die Überstände von den Keratinozyten für weitere 24h wieder auf normale Fibroblasten transferiert und daraufhin wurde deren Aktivierung untersucht.

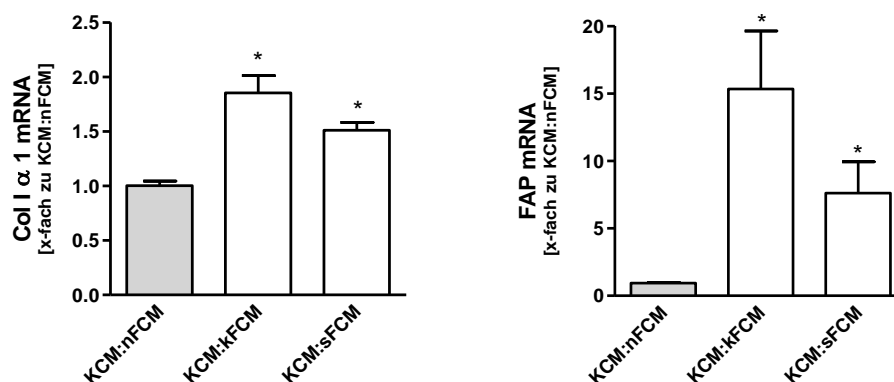


**Abbildung 14. Experimenteller Aufbau zur Analyse der potentiellen doppelt-parakrinen Wirkung von KGF.**

Die konditionierten Medien (CM) von normalen (NF), so wie von Keloid- (KF) und Sklerodermie-Fibroblasten (SF) wurden auf normale Keratinozyten (NK) gegeben. Nach 24h wurden diese Keratinozyten-konditionierten Medien (KCM) auf normale Fibroblasten transferiert. Die NF wurden für weitere Analysen 24h mit den KCM inkubiert.

Im Vergleich zur Inkubation mit Keratinozyten-Überständen, welche mit den konditionierten Medien von normalen Fibroblasten (KCM:nFCM) behandelt wurden, erhöhte sich sowohl die

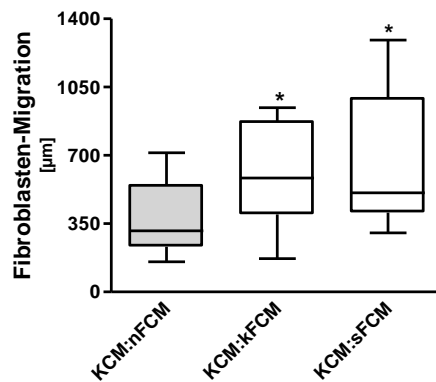
ColI $\alpha$ 1-, als auch die FAP-Expression in NF signifikant, wenn sie mit den Überständen von Keratinozyten (KCM) inkubiert wurden, die davor mit konditionierten Medien von Keloid-Fibroblasten (KCM:kFCM) oder Sklerodermie-Fibroblasten (KCM:sFCM) kultiviert wurden (siehe Abbildung 15).



**Abbildung 15. Kollagen Typ I  $\alpha$ 1 und FAP mRNA Expression in NF mit KCM**

Die Expression von Kollagen Typ I  $\alpha$ 1 und FAP mRNA war signifikant erhöht in NF, welche mit KCM:kFCM und KCM:sFCM inkubiert wurden im Gegensatz zu NF mit KCM:nFCM (alle n=4).

Neben der Expressionsanalyse der Aktivitäts-Marker wurden auch funktionelle Assays durchgeführt, um einen möglichen Einfluss auf das Proliferations- und das Migrationsverhalten der Fibroblasten zu untersuchen. Während die Fibroblastenproliferation unbeeinträchtigt blieb, war die NF-Migration nach Inkubation mit KCM:kFCM bzw. KCM:sFCM im Vergleich zu KCM:nFCM signifikant verstärkt (siehe Abbildung 16).



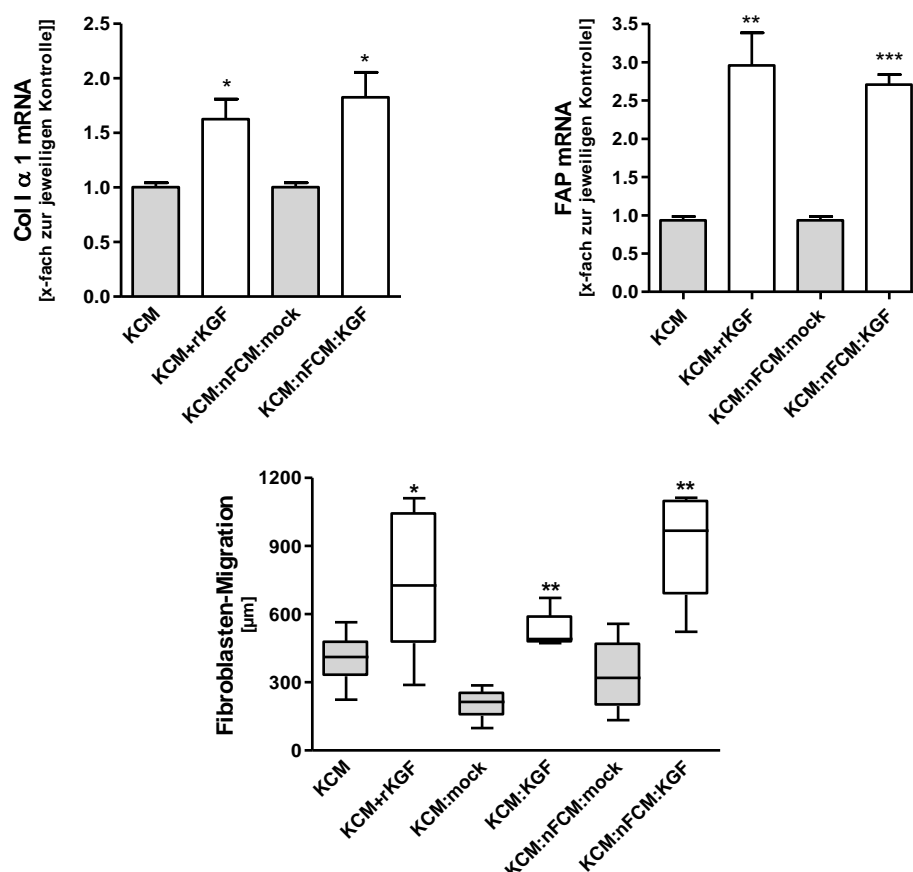
**Abbildung 16. Fibroblasten-Migration bei Inkubation mit KCM.**

Mittels des Scratch-Wundheilungs-Assays wurde das Migrationsverhalten der Fibroblasten untersucht. NF, welche mit KCM:kFCM und KCM:sFCM inkubiert wurden, migrierten signifikant weiter als NF, die mit KCM:nFCM kultiviert wurden.

Um herauszufinden, ob die Aktivierung der Fibroblasten tatsächlich allein durch KGF hervorgerufen werden kann, wurden NF für 24h mit den Überständen unbehandelter Keratinozyten (KCM) und mit rekombinantem KGF behandelter Keratinozyten (KCM+rKGF) inkubiert. Sowohl die Expression von Coll $\alpha$ 1 und FAP, als auch die Migration der NF stieg nach Behandlung mit KCM+rKGF verglichen mit KCM alleine signifikant an.

Noch deutlicher war der indirekte KGF-Effekt, wenn KGF von den Zellen selbst produziert wurde. Zum einen wurden NF mit einem KGF-Expressionskonstrukt bzw. einem Kontrollkonstrukt transfiziert. Die konditionierte Medien der KGF-transfizierten NF (nFCM:KGF) bzw. der kontrolltransfizierten NF (nFCM:mock) wurden auf NK übertragen, bevor diese Überstände (KCM:nFCM:KGF bzw. KCM:nFCM:mock) wiederum auf NF gegeben wurden. Die Expression beider Aktivitätsmarker sowie das Migrationsverhalten der NF, die mit KCM:nFCM:KGF inkubiert wurden, waren signifikant verstärkt im Vergleich zu NF, die mit KCM:nFCM:mock kultiviert wurden (siehe Abbildung 17). Auch wenn die NF mit Überständen von KGF-transfizierten Keratinozyten (KCM:KGF) inkubiert wurden, migrierten sie mehr als nach Inkubation mit den Überständen von kontrolltransfizierten Keratinozyten (KCM:mock).



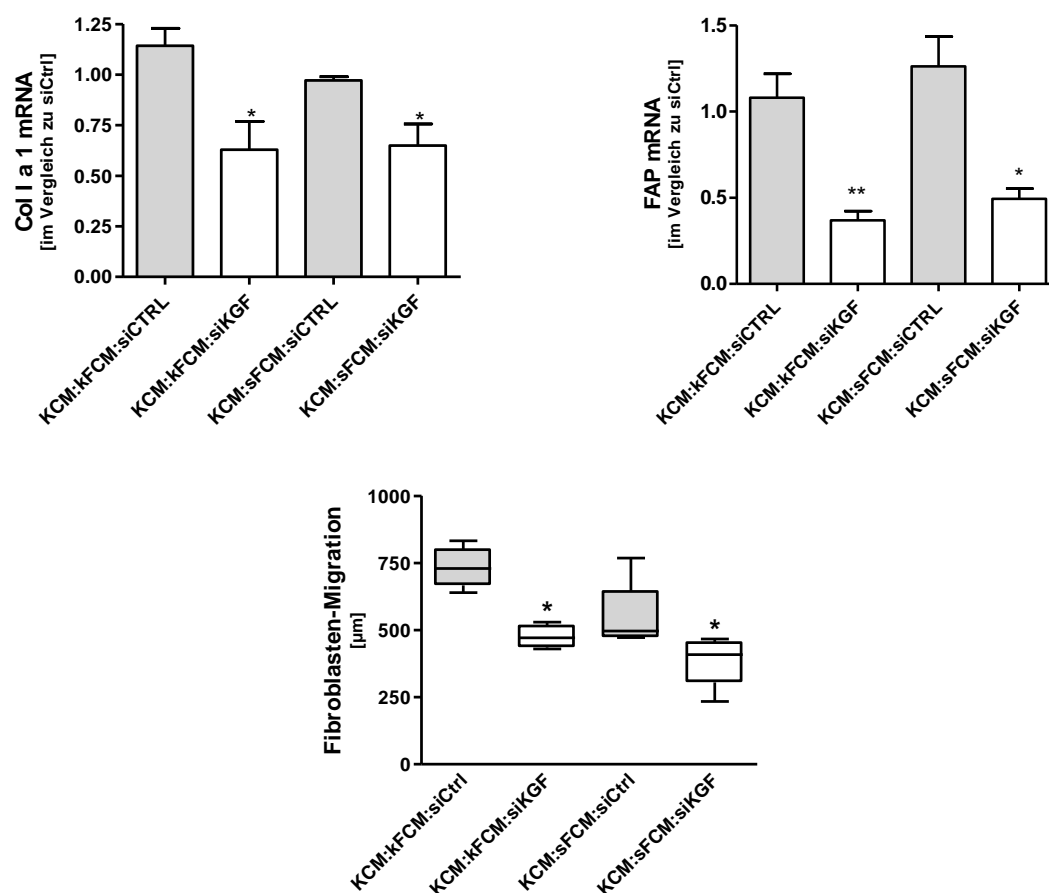


**Abbildung 17. Doppelt parakriner Einfluss von KGF auf die Fibroblasten-Aktivität.**

Sowohl die Expression der Aktivitätsmarker ColI  $\alpha$ 1 und FAP als auch die Fibroblasten-Migration war signifikant verstärkt, wenn die NF mit Überständen von Keratinozyten inkubiert wurden, welche entweder mit rekombinantem KGF stimuliert wurden bzw. mit sekretiertem KGF durch Überexpression. (alle n=4, bis auf die Fibroblasten-Migration mit KCM bzw. KCM+rKGF; hier n=14)

Um zu beweisen, dass die Fibroblasten-Aktivierung nach Inkubation mit KCM:kFCM und KCM:sFCM wirklich in Abhängigkeit von KGF erfolgt, sollte geprüft werden, ob eine Inhibition der KGF-Expression auch eine Verminderung der Aktivierung zur Folge hätte. Zum Zweck der KGF-Hemmung wurden zwei siRNAs verwendet, die beide einen Knockdown der KGF-Expression um 70-80% vermittelten.

NF, die mit Überständen von Keratinozyten behandelt wurden, welche zuvor mit konditionierten Medien von KGF-siRNA-behandelten KF bzw. SF (KCM:kFCM:siKGF bzw. KCM:sFCM:siKGF) inkubiert wurden, zeigten im Gegensatz zur Kontrolltransfektion (KCM:kFCM:siCTRL und KCM:sFCM:siCTRL) signifikant verminderte Aktivitätsmerkmale wie aus Abbildung 18 deutlich hervorgeht.



**Abbildung 18. Einfluss eines Knockdowns der KGF-Expression auf die Fibroblasten-Aktivität.**

Die KGF-Expression von KF und SF wurde mittels siRNA herunterreguliert. Die Überstände wurden auf Keratinozyten transferiert und nach 24h auf NF gegeben. Die NF welche mit KCM:kFCM:siKGF bzw. KCM:sFCM:siKGF inkubiert wurden, exprimierten signifikant weniger ColI  $\alpha$ 1 und FAP (jeweils n=3) und migrierten schwächer (jeweils n=4) als NF, welche mit KCM:kFCM:siCTRL und KCM:sFCM:siCTRL kultiviert wurden.

### 3.3 Die Fibroblasten-Aktivierung wird durch KGF induzierte OSM-Sekretion von Keratinozyten vermittelt

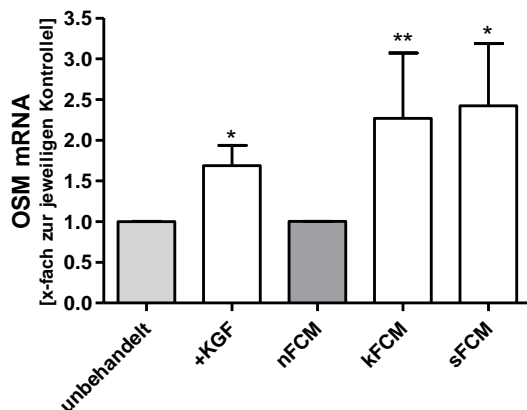
Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Aktivierung der Fibroblasten auf die doppelt parakrine Wirkungsweise von KGF zurückzuführen ist, wollten wir herausfinden, auf welche Weise diese Aktivierung vermittelt wird. Wir konnten davon ausgehen, dass die Aktivierung durch Faktoren vermittelt wird, welche die Keratinozyten auf den KGF-Stimulus hin exprimieren. Da Keratinozyten und Fibroblasten in der menschlichen Haut nicht in direktem Kontakt stehen, waren also vor allem sekretierte Moleküle von Interesse. Zur Identifikation der potentiell verantwortlichen Faktoren, wurden die Überstände von Keratinozyten, welche über 24h mit rekombinantem KGF behandelt wurden, sowie die Überstände unbehandelter Keratinozyten verwendet. Diese Überstände wurden auf einen Zytokin-Array (RayBio® Human Cytokine

Antibody Array V) gegeben, welcher ein Spektrum von 80 Zytokinen und Wachstumsfaktoren abdeckt. Daraufhin wurden die Überstände auf differentiell sekretierte Faktoren hin untersucht. Dazu wurde die Pixel-Dichte der einzelnen Array-Spots mit Adobe-Photoshop ausgewertet. Erstaunlicherweise erwies sich nur ein einziges Zytokin als zellspenderunabhängig differentiell reguliert: Oncostatin M. Die Sekretion aller anderen Zytokine wies keine signifikante Veränderung nach KGF-Behandlung auf. Die Array-Ergebnisse wurden mittels RT-PCR überprüft. Die Tabelle 2 zeigt eine Übersicht von Faktoren aus dem Zytokin-Array, die in fibroproliferativen Erkrankungen von Bedeutung sind und ihre das Verhältnis ihrer Expression in KGF-behandelten Keratinozyten im Vergleich zu unbehandelten Keratinozyten.

Faktor	Pixel-Dichte (x-fach nach KGF- Behandlung)	mRNA Expression (x-fach nach KGF- Behandlung)	p-Wert der mRNA- Expressions- unterschiede (n.s.=p> 0,05)
FGF2	0,9455	0,7598	n.s.
<b>OSM</b>	1,6728	<b>2,2301</b>	0,0262
IL1-alpha	0,9535	0,7468	n.s.
RANTES	1,5340	1,5732	n.s.
IL-1beta	1,0262	0,7611	n.s.
SCF	1,0539	1,0078	n.s.
VEGF	0,9471	0,9123	n.s.
PDGF-BB	0,8843	0,9310	n.s.
TGF- $\beta$ 2	1,0368	1,1803	n.s.
IL-6	0,8649	0,8276	n.s.
HGF	0,8729	0,8906	n.s.
TGF- $\beta$ 1	0,9505	0,9951	n.s.
MCP-1	0,7498	1,370	n.s.
TIMP-1	0,8706	1,036	n.s.
TIMP-2	0,8908	0,9615	n.s.

**Tabelle 2. Expressionsverhältnisse verschiedener Faktoren in KGF-behandelten Keratinozyten im Vergleich zu Unbehandelten.**

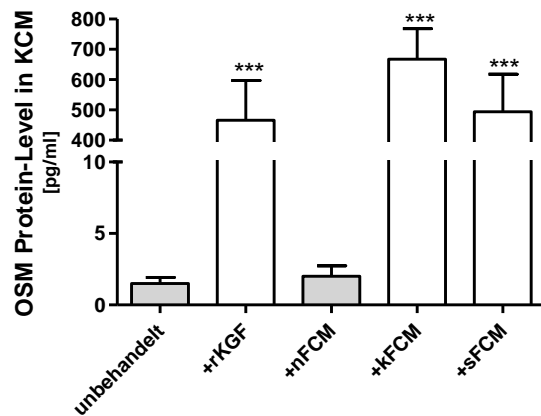
Oncostatin M ist ein pleiotropes Zytokin der Interleukin-6-Familie, deren Mitglieder eine Vielzahl zellulärer Prozesse vermitteln darunter Entzündungsreaktionen und Autoimmunität (Silver und Hunter, 2010). Es galt nun zu prüfen, welche Rolle OSM bei der indirekten Fibroblasten-Aktivierung durch KGF spielt. Dazu wurde zunächst untersucht, inwiefern die OSM-Expression von Keratinozyten durch verschiedene konditionierte Medien von Fibroblasten beeinflusst werden kann. NK, welche mit rekombinantem KGF oder kFCM bzw. sFCM inkubiert wurden, zeigten eine signifikant erhöhte OSM-mRNA-Expression im Vergleich zu unbehandelten NK bzw. NK nach nFCM-Behandlung (siehe Abbildung 19).



**Abbildung 19. OSM mRNA Expression in Keratinozyten nach KGF- bzw. FCM-Behandlung.**

Mittels RT-PCR wurden die OSM-Expression analysiert. Nach Behandlung von NK mit rKGF (n=6) stieg die OSM-Expression im Vergleich zu unbehandelten NK (n=6) signifikant an. Ebenso war sie in NK, welche mit kFCM (n=5) bzw. sFCM (n=4) inkubiert wurden, im Vergleich zur Behandlung mit nFCM (n=5) signifikant erhöht.

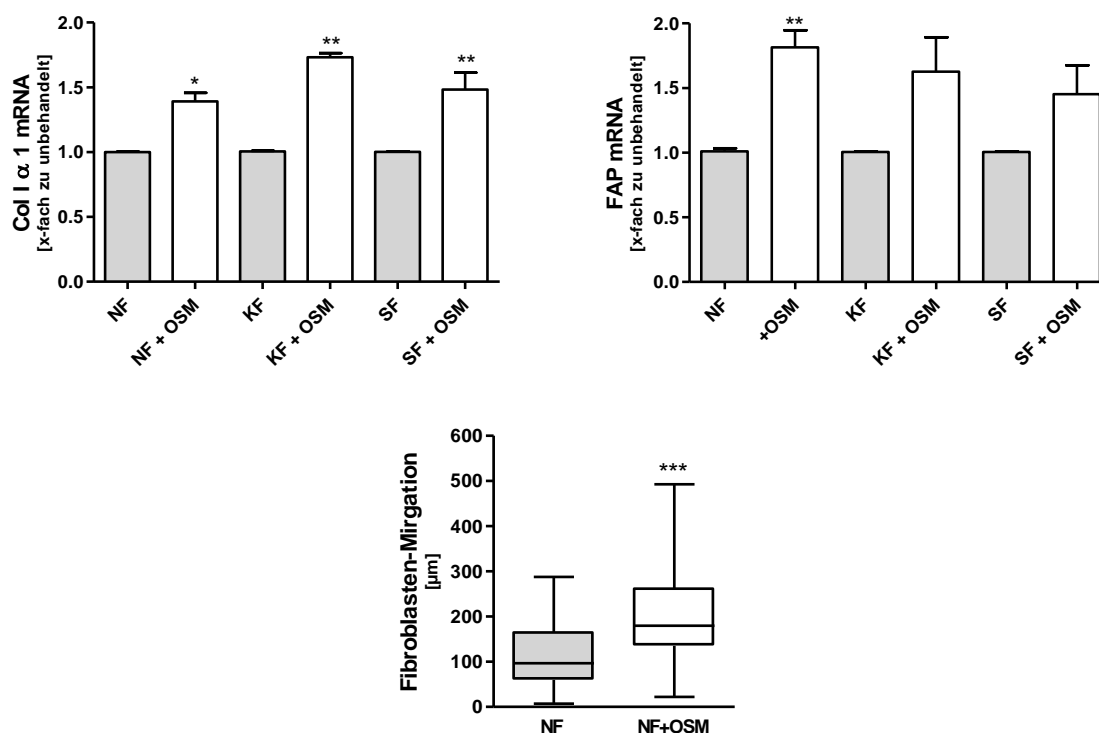
Auf Protein-Ebene waren die Effekte noch deutlicher sichtbar. Wie aus Abbildung 20 hervorgeht, stiegen die OSM-Protein-Mengen nach Gabe von rekombinantem KGF bzw. nach Inkubation mit kFCM und sFCM in den Keratinozyten-Überständen um das 400-700-fache an, im Vergleich zu den Überständen von unbehandelten Keratinozyten bzw. nFCM-behandelten Keratinozyten.



**Abbildung 20. OSM Protein-Menge in Keratinozyten-Überständen nach KGF- bzw. FCM-Behandlung.**

Zur Analyse der OSM-Proteinmengen wurde ein OSM-ELISA verwendet. Im Vergleich zu unbehandelten Keratinozyten (n=6) und nFCM-behandelten Keratinozyten (n=5) war die OSM-Sekretion nach Inkubation mit rKGF (n=5) und kFCM (n=5) bzw. sFCM (n=4) extrem verstärkt.

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass OSM alleine aktivierende Effekte auf Fibroblasten vermitteln kann. Die Abbildung 21 zeigt, dass sowohl die  $\text{ColI}\alpha 1$ - und die FAP- $\alpha$ -Expression in normalen und Keloid- bzw. Sklerodermie-Fibroblasten als auch das Migrationsverhalten von NF nach Gabe von rekombinantem OSM signifikant anstiegen.

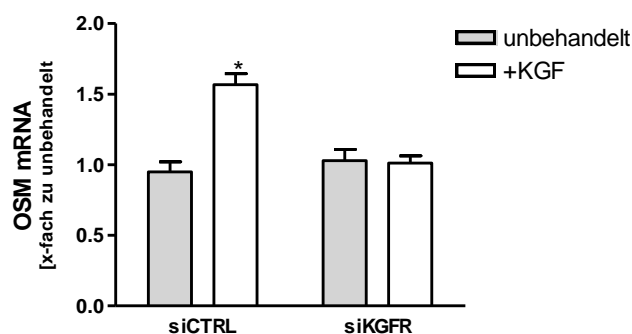


**Abbildung 21. Direkte Effekte von rekombinantem OSM auf die Fibroblasten-Aktivität.**

Mittels RT-PCR konnte gezeigt werden, dass die Expression von ColI  $\alpha$ 1 und FAP nach Behandlung mit rekombinantem OSM in NF, KF und SF signifikant anstiegen. Auch die Migration von NF konnte durch OSM-Behandlung verstärkt werden.

Um zu beweisen, dass OSM nur in Abhängigkeit des KGF-Stimulus von den Keratinozyten produziert wird, wurden NK mit zwei verschiedenen siRNAs gegen den KGF-Rezeptor (KGFR) transfiziert. Die Expression von KGFR wurde in beiden Fällen um mindestens 70% herunterreguliert.

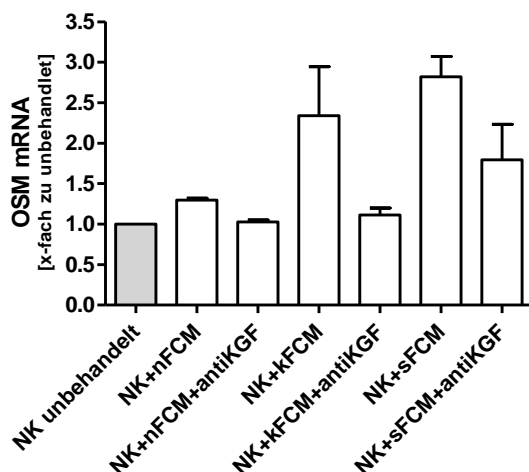
Wie aus der Abbildung 22 hervorgeht, konnte bei den KGFR-siRNA-transfizierten Keratinozyten durch Behandlung mit rekombinantem KGF keine verstärkte OSM-Expression mehr ausgelöst werden.



**Abbildung 22. OSM mRNA Expression in Keratinozyten nach KGF Behandlung bei simultanem KGFR-Knockdown.**

NK wurden mit siRNA gegen KGFR transfiziert und anschließend mit rekombinantem KGF behandelt. Mittels RT-PCR konnte gezeigt werden, dass die siKGFR-transfizierten (n=3) im Vergleich zu den kontrolltransfizierten NK (n=3) nach rKGF-Behandlung nicht mehr mit verstärkter OSM-Expression reagierten.

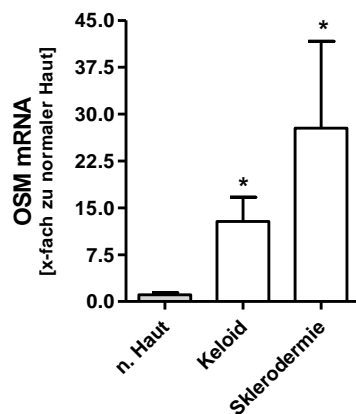
Ein weiteres Experiment um die KGF-Abhängigkeit der OSM-Expression in Keratinozyten zu beweisen, wurde mit inhibierenden KGF-Antikörpern durchgeführt. Durch Zugabe von KGF-neutralisierenden Antikörpern zu den konditionierten Fibroblasten-Medien während der Inkubation wurde die OSM-Expression in Keratinozyten deutlich gesenkt (siehe Abbildung 23).



**Abbildung 23. OSM mRNA Expression in Keratinozyten nach Behandlung mit FCM bei simultaner KGF-Inhibition.**

Durch Zugabe von inhibitorischen Antikörpern gegen KGF zu den FCM wurden die hochregulierenden Effekte von kFCM und sFCM auf die OSM-Expression von NK deutlich gesenkt.

Interessanterweise konnte auch in Keloid- und Sklerodermie-Gewebe eine stark erhöhte OSM-Expression im Vergleich zu normaler Haut festgestellt werden wie man in Abbildung 24 erkennen kann.



**Abbildung 24. Expression von OSM in gesundem und erkranktem Gewebe.**

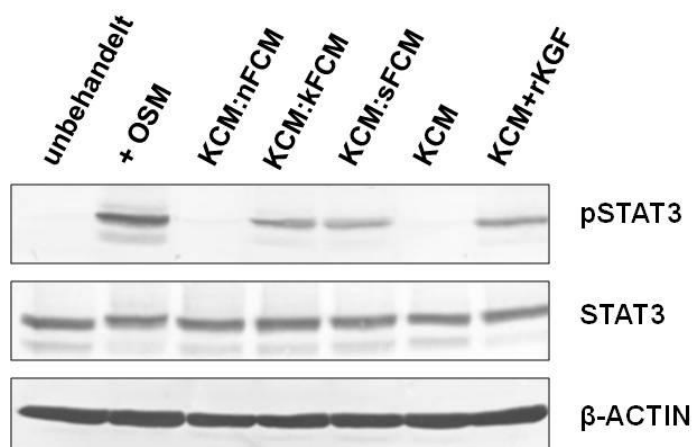
Die OSM-mRNA Expression war in FFPE-Gewebe Keloid- (n=5) und Sklerodermie-Patienten (n=4) im Vergleich zu normaler Haut signifikant erhöht.

### 3.4 OSM löst in Fibroblasten die Phosphorylierung von STAT3 aus

Bisher konnten wir zeigen, dass die verstärkte KGF-Expression von Keloid- und Sklerodermie-Fibroblasten in epidermalen Keratinozyten die Sekretion von OSM induziert, was wiederum aktivierend auf die Fibroblasten wirkt. Es ist bekannt, dass OSM sowohl mit dem Typ I OSM-Rezeptor, der aus dem gp130- und dem LIF-Rezeptor besteht, als auch mit Typ II OSM-Rezeptor, zusammengesetzt aus gp130 mit der OSM-Rezeptor  $\beta$ -Untereinheit, interagiert. Die STAT- (Signal Transducer and Activator of Transcription) Familie ist an der OSM-Signaltransduktion beteiligt (Dreuw et al., 2005). Zudem wurde mehrfach gezeigt, dass gp130/STAT3-Signaltransduktion eine Rolle bei fibrosierenden Erkrankungen spielt (Heinrich et al., 1998; Lim et al., 2006).

Aus diesem Grund untersuchten wir die Aktivierung des STAT3-Signalwegs in Abhängigkeit von OSM in Fibroblasten mittels Western Blot Analyse. Wie man in Abbildung 25 erkennen kann wurde nach OSM-Behandlung die Phosphorylierung von STAT3 in Fibroblasten sehr stark induziert. Auch die Inkubation der Fibroblasten mit KCM:kFCM bzw. KCM:sFCM hatte STAT3-Phosphorylierung zur Folge, während die Behandlung mit KCM:nFCM keine Aktivierung des STAT3-Signalwegs auslöste. Die Überstände von KGF-behandelten Keratinozyten (KCM+rKGF) führten in Fibroblasten ebenfalls zu einer starken STAT3-Phosphorylierung, während die Überstände unbehandelter Keratinozyten (KCM) keinerlei Einfluss auf die STAT3-Aktivierung zeigten.

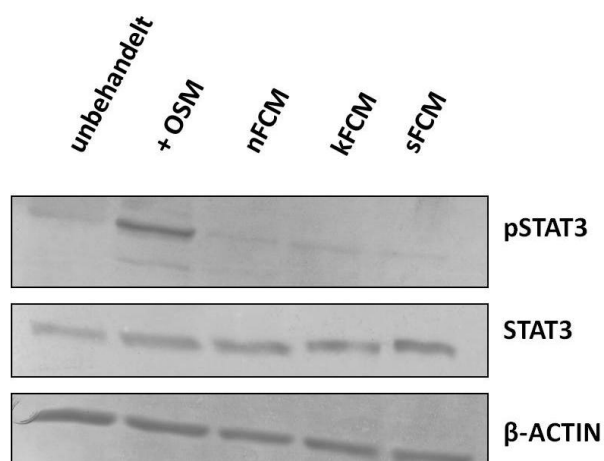




**Abbildung 25. STAT3-Phosphorylierung in Fibroblasten nach OSM- bzw. KCM-Behandlung.**

Mithilfe von spezifischen Antikörpern gegen STAT3 und phosphoryliertes STAT3 konnte mittels Western Blot Analyse gezeigt werden, dass die Behandlung von NF mit rekombinantem OSM bzw. KCM:kFCM, KCM:sFCM und KCM+rKGF die Phosphorylierung von STAT3 auslösten, während nach in unbehandelten NF bzw. NF mit KCM:nFCM und KCM alleine keine STAT3-Phosphorylierung zu sehen war.

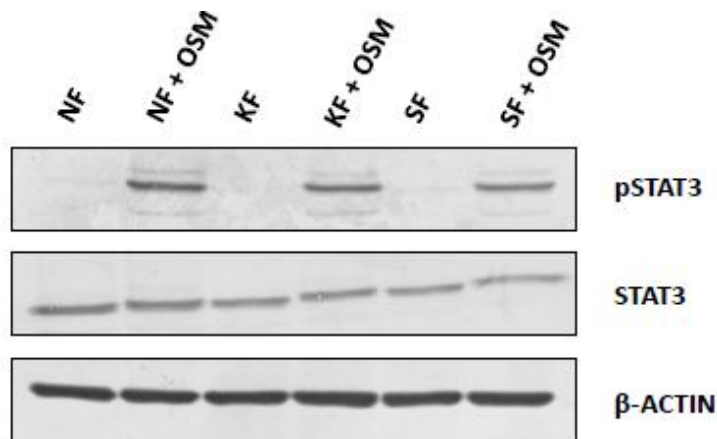
Um sicherzugehen, dass jede Form von unspezifischen aktivierenden Effekten ausgeschlossen werden kann, wurden die Fibroblasten auch direkt mit den jeweiligen FCM behandelt. In der Abbildung 27 kann man erkennen, dass die Behandlung hierbei keinerlei STAT3-Phosphorylierung auslöste. Zur Kontrolle wurden wieder unbehandelte NF und OSM-behandelte NF mitgeführt.



**Abbildung 26. STAT3/pSTAT3-WB mit direkt FCM-behandelten Fibroblasten**

Die direkte Behandlung von NF mit den jeweiligen FCM löste keine Aktivierung von STAT3 aus.

Darüber hinaus wollten wir überprüfen, ob auch Keloid- und Sklerodermie-Fibroblasten sensitiv auf OSM-Stimuli reagieren. Abbildung 27 zeigt, dass die Behandlung mit rekombinantem OSM in Fibroblasten jeden Ursprungs die Phosphorylierung von STAT3 vermitteln kann.



**Abbildung 27. STAT3-Aktivierbarkeit in normalen und Keloid- zw. Sklerodermie-Fibroblasten.**

Durch Behandlung mit rekombinantem OSM konnte sowohl in NF, als auch in KF und SF STAT3-Phosphorylierung induziert werden.

Nun wollten wir herausfinden, ob die Aktivierung von STAT3 tatsächlich über einen doppelt parakrinen Feedbackloop von KGF abhängt. Wie man schon in Abbildung 25 sehen konnte, löst die Inkubation von Fibroblasten mit KCM:nFCM alleine keine STAT3-Phosphorylierung aus. Wurden die NF jedoch zuvor mit einem KGF-Expressionskonstrukt transfiziert, deren konditionierte Medien auf Keratinozyten gegeben bevor sie zurück auf NF transferiert wurden (KCM:nFCM:KGF), wurde der STAT3- Signalweg stark aktiviert, während KCM:nFCM:mock keinen Einfluss zeigte. Im Gegenzug wurde die aktivierende Wirkung von KCM:kFCM stark herabgesetzt, wenn die KF zuvor mit siRNA gegen KGF behandelt wurden. Zur Kontrolle wurden wieder unbehandelte sowie KGF- und OSM-behandelte NF mitgeführt (siehe Abbildung 28).

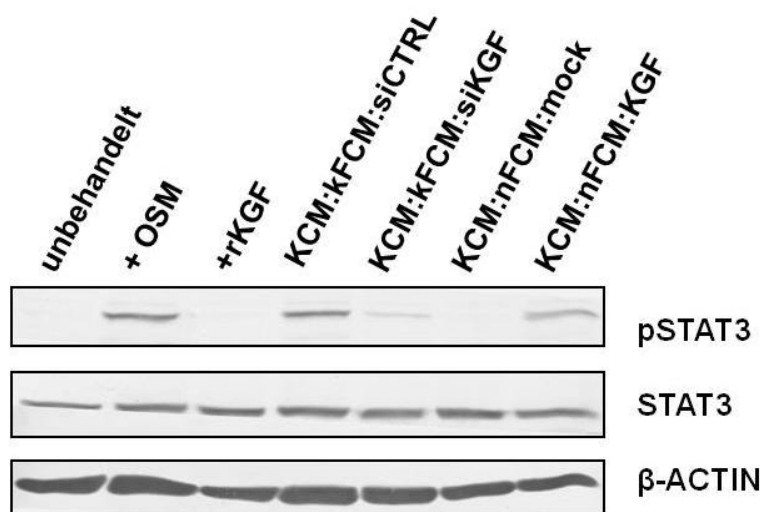


Abbildung 28. Indirekte Abhängigkeit der STAT3-Aktivierbarkeit von KGF.

Darüber hinaus wurde OSM mithilfe inhibitorischer Antikörper in den KCM inaktiviert. Die Aktivierung von STAT3 nach Behandlung mit rekombinantem OSM konnte weitestgehend unterdrückt werden, wenn dem Medium die OSM-blockierenden Antikörper beigefügt wurden. Auch die Phosphorylierung von STAT3 durch Inkubation der NF mit KCM:kFCM und KCM:sFCM konnte nur in Anwesenheit von OSM ausgelöst werden (siehe Abbildung 29).

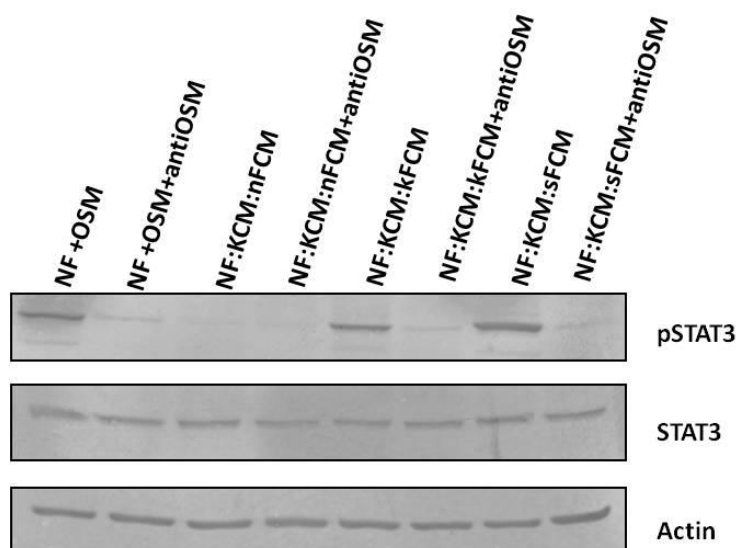


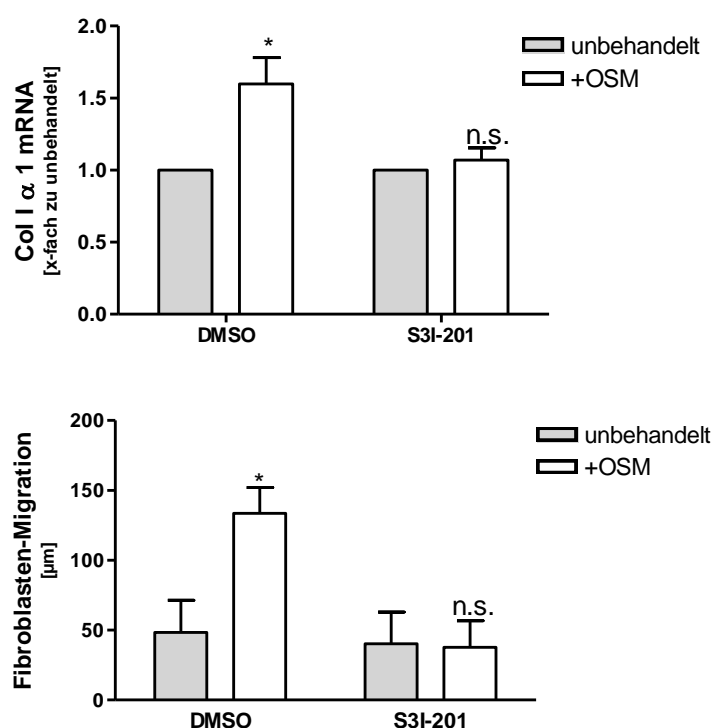
Abbildung 29. Direkte Abhängigkeit der STAT3-Phosphorylierung von OSM.

Durch Zugabe von inhibitorischen Antikörpern zum Medium mit rekombinantem OSM bzw. zu KCM:kFCM und KCM:sFCM konnte die STAT3-Phosphorylierung unterbunden werden.

### 3.5 Die KGF- OSM-induzierte STAT3-Aktivierung ist wesentlich für die Fibrogenese

Keloid- und Sklerodermie-Fibroblasten exprimieren erhöhte Mengen an KGF, welche in Keratinozyten zu einer verstärkten OSM-Sekretion führen. OSM hat wiederum eine aktivierende Wirkung auf Fibroblasten und führt dort zur Phosphorylierung von STAT3. Nun galt es zu klären, ob die aktivierenden Effekte der KGF-OSM-Rückkopplungsschleife über den STAT3-Signalweg vermittelt werden.

Zu diesem Zweck wurden NF mit dem STAT3-Inhibitor S3I-201 behandelt, der eine Phosphorylierung von STAT3 verhindert. Bemerkenswerterweise konnten in NF nach S3I-201-Vorbehandlung die aktivierenden Effekte von OSM auf die ColI $\alpha$ 1-Expression und die Migration unterdrückt werden (siehe Abbildung 30).

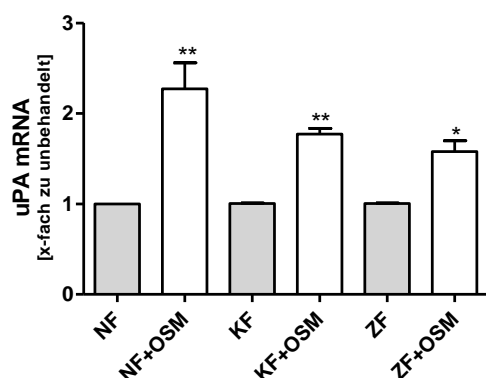


**Abbildung 30. Abhängigkeit der Kollagen Typ I  $\alpha$ 1-Expression und der Fibroblasten-Migration von der STAT3-Aktivierung.**

Die Inhibition der STAT3-Signaltransduktion hatte zur Folge, dass die ColI  $\alpha$ 1-Expression sowie die Fibroblasten-Migration nicht mehr durch Behandlung mit rekombinantem KGF induzierbar waren.

Dauer et al. beschrieben den Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator (uPA), der eine wichtige Rolle bei einer Vielzahl zellulärer Prozesse wie Angiogenese, EZM-Degradation und Tumormalignität (Postiglione et al., 2010) spielt, als migrationsassoziiertes Zielgen von STAT3 (Dauer et

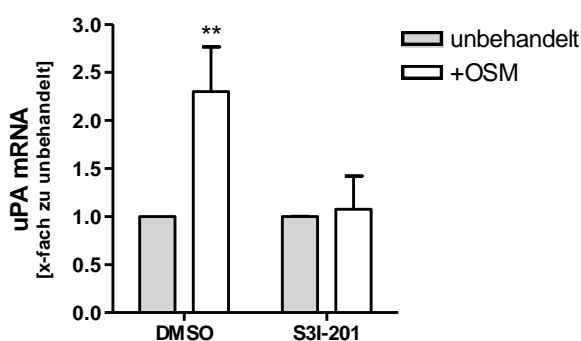
al., 2005). Wir spekulierten, dass die Expression von uPA auch in Fibroblasten durch OSM-induziert werden und für die verstärkte Migration verantwortlich sein könnte. Tatsächlich konnten wir zeigen, dass die uPA-Expression durch Behandlung mit rekombinantem OSM sowohl in normalen Fibroblasten als auch in den Fibroblasten von Keloid- und Sklerodermie-Patienten induziert werden konnte (siehe Abbildung 31).



**Abbildung 31. Expression von uPA mRNA nach OSM-Behandlung in normalen und Keloid- bzw. Sklerodermie-Fibroblasten.**

Mittels RT-PCR konnte deutlich gezeigt werden, dass die Expression von uPA sowohl in NF (n=3) als auch in KF(n=3) und SF (n=2) nach Behandlung mit rekombinantem OSM signifikant anstieg.

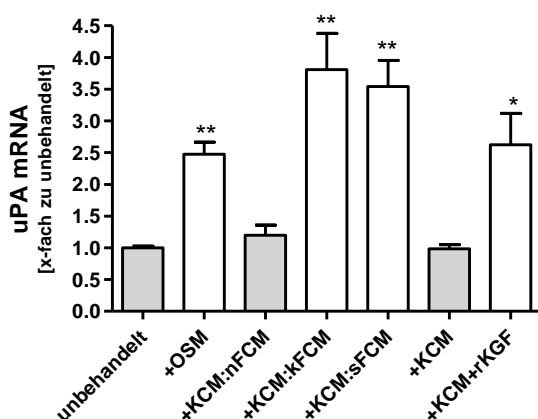
In Analogie zu Dauer et al. konnten wir bestätigen, dass uPA ein STAT3-Zielgen ist, indem die NF vor OSM-Gabe mit dem STAT3-Inhibitor S3I-201 (100 $\mu$ M) behandelt wurden. Wie in der Abbildung 32 klar zu erkennen ist, konnte durch die Inhibition der STAT3-Phosphorylierung eine Hochregulation der uPA-Expression durch Behandlung mit rekombinantem OSM verhindert werden.



**Abbildung 32. Abhängigkeit der uPA-Expression von der STAT3-Aktivierung in Fibroblasten.**

Die Inhibition des STAT3-Signalwegs in Fibroblasten verhinderte einen Anstieg der uPA-mRNA Expression nach OSM-Behandlung.

Neben der direkten OSM-Gabe führte auch die Behandlung von Fibroblasten mit KCM:kFCM, KCM:sFCM und KCM+rKGF zu einem Expressionsanstieg, während sich in unbehandelten Fibroblasten und nach Inkubation mit KCM:nFCM oder KCM alleine keine Erhöhung der uPA-Expression einstellte (siehe Abbildung 33).

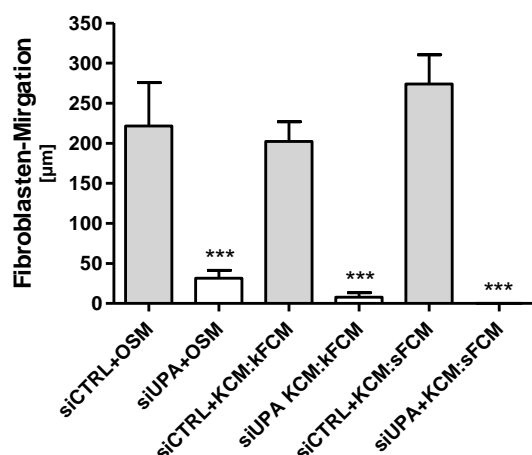


**Abbildung 33. uPA mRNA Expression in Fibroblasten nach OSM- und KCM-Behandlung.**

Die Expression von uPA stieg in Fibroblasten nach Behandlung mit rekombinantem OSM (n=4) im Vergleich zu unbehandelten Fibroblasten (n=6) signifikant an. Auch die Inkubation mit KCM:kFCM und KCM:sFCM (jeweils n=5) ließ die uPA-Expression im Gegensatz zu KCM:nFCM (n=6) stark ansteigen. Die Überstände von KGF-behandelten Keratinozyten induzierten im Gegensatz zu den Überständen unbehandelter Keratinozyten (jeweils n=4) ebenfalls einen signifikanten Anstieg der uPA-mRNA-Expression.

Die Abhängigkeit der Fibroblasten-Migration von der STA3-induzierten uPA-Expression sollte durch uPA-Knockdown mittels siRNA überprüft werden. Dazu wurden zwei siRNAs gegen uPA verwendet, welche einen ca. 80%-igen Knockdown von uPA vermittelten. Die Abbildung 34 zeigt, dass die verstärkte Fibroblasten-Migration, die sich auf OSM-Gabe bzw. auf Inkubation

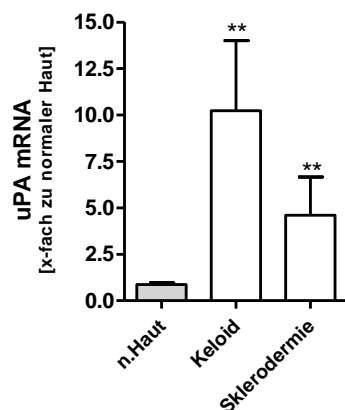
mit OSM-haltigen konditionierten Medien (KCM:kFCM und KCM:sFCM) einstellte, durch Transfektion der NF mit siRNA gegen uPA komplett unterbunden werden konnte.



**Abbildung 34. Abhängigkeit der OSM-induzierten Fibroblasten-Migration von uPA.**

Nach Transfektion der NF mit siRNA gegen uPA konnte im Vergleich zu kontroll-transfizierten Zellen weder durch Behandlung mit rekombinatem OSM (jeweils n=5) noch durch KCM:kFCM bzw. KCM:sFCM (jeweils n=3) Fibroblasten-Migration ausgelöst werden.

In Übereinstimmung mit unserer Hypothese fanden wir die Expression von uPA in Keloid- und Sklerodermie-Gewebe im Gegensatz zu normaler Haut signifikant erhöht (siehe Abbildung 35).



**Abbildung 35. Expression von uPA mRNA Expression in FFPE-Gewebe.**

Im Vergleich zu normaler Haut war die Expression von uPA FFPE-Gewebe von Keloid- und Sklerodermie-Patienten im Vergleich zu gesunder Haut signifikant erhöht.

### 3.6 Die Behandlung humaner Haut mit rekombinantem KGF führt zur Expression von Fibrosemarkern

Um die Relevanz der bisher präsentierten Ergebnisse zu bekräftigen, wurde der Einfluss von KGF auf die humane Haut mithilfe eines *ex vivo*-Experiments untersucht. Für diese Analyse, wurden Stücke menschlicher Vollhaut in Hepes-Agar mit serumhaltigen DMEM-Medium eingebettet und mit rekombinantem KGF behandelt. Nach 24h bzw. 48h wurde aus den Hautstückchen RNA isoliert. Anschließend wurde die Expression aller Faktoren untersucht, deren Beteiligung in dem bisher aufgedeckten Feedbackloop zwischen Fibroblasten und Keratinozyten in dieser Studie beschrieben wurden. Bemerkenswerterweise, stieg die Expression von OSM, FAP- $\alpha$ , ColI $\alpha$ 1 sowie von uPA nach KGF-Behandlung signifikant an.

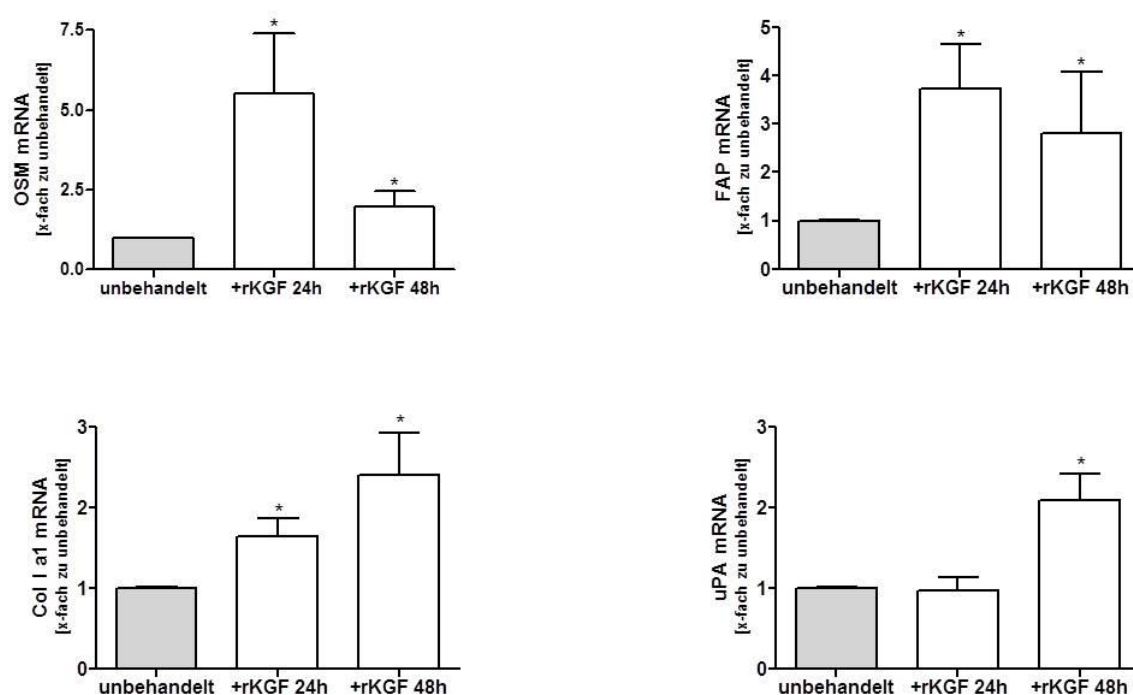


Abbildung 36. Expression von OSM, FAP, Kollagen TypI  $\alpha$ 1 und uPA in humaner Haut nach Behandlung mit rekombinantem KGF.

Zusammengefasst wird mit dieser Arbeit eine neue Idee zur Fibroblasten-Aktivierung in kutaner Fibrose präsentiert. Es konnte gezeigt werden, dass die dermalen Fibroblasten von Keloid- und Sklerodermie-Patienten verstärkt KGF exprimieren. Die erhöhte KGF-Expression wiederum löst in den Keratinozyten der Epidermis eine verstärkte Sekretion von Oncostatin M aus. OSM hat seinerseits eine aktivierende Wirkung auf die Fibroblasten: die Expression von Kollagen Typ I  $\alpha$ 1, sowie des Fibroblasten-aktivierenden Proteins- $\alpha$  steigt an, der Transkriptionsfaktor STAT3



wird phosphoryliert und verstärkt über die Induktion des Urokinase-Typ Plasminogen Aktivators (uPA) das Migrationsverhalten der Fibroblasten.

## 4 Diskussion

Kutane Fibrose ist das Ergebnis übermäßiger extrazellulärer Matrix-Synthese und -Ablagerung. Dieses Charakteristikum ist auf die Aktivierung der dermalen Fibroblasten in fibrosierenden Erkrankungen des Bindegewebes zurückzuführen. Bisher ist der molekulare Auslöser für diese Fibroblasten-Aktivierung unbekannt und fibroproliferative Hautkrankheiten sind bis heute nicht effizient therapierbar. Man weiß jedoch, dass epithelial-mesenchymale Wechselwirkungen eine wichtige Rolle für die Homöostase der Haut spielen. Ein bedeutender Faktor für diese Kommunikation zwischen Fibroblasten und Keratinozyten ist der Keratinozytenwachstumsfaktor, KGF. Im Rahmen dieser Arbeit, sollte die Expression und Funktion von KGF in fibrosierenden Hautkrankheiten und dabei exemplarisch in Keloid und Sklerodermie untersucht werden.

### 4.1 Die Bedeutung von KGF in fibrotischen Erkrankungen der Haut

Interessanterweise konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Expression von KGF in dermalen Fibroblasten von Keloid- und Sklerodermie-Patienten sowohl auf mRNA-, als auch auf Protein-Ebene konstitutiv überexprimiert wird. Diese erhöhte KGF-Expression war auch in den Seren von Patienten, so wie in immunhistologisch gefärbten Gewebeschnitten detektierbar. Da KGF mitogen auf Keratinozyten wirkt, bietet dieses Ergebnis auch eine Erklärung für die bei Keloiden häufig als verdickt beschriebene Epidermis (Kischer et al., 1982; Ong et al., 2010) und für die dickere Epidermis bei Kokultur von normalen Keratinozyten mit Keloid-Fibroblasten in organotypischen Kulturen (Butler et al., 2008). Im Gegensatz dazu konnten Dang *et. al.* zeigen, dass bei embryonaler, narbenfreier Wundheilung die Expression von FGFs herunterreguliert ist (Dang et al., 2003).

Es kann spekuliert werden, dass die konstitutiv erhöhte Expression von KGF in dermalen Fibroblasten auf eine genetische Ursache zurückzuführen ist. Der erhöhte KGF-Spiegel, der in den Patientenseren gemessen wurde, könnte ein weiterer Hinweis dafür sein, dass betroffene Individuen KGF in all ihren mesenchymalen Zellen übermäßig exprimieren und dass dadurch die Entstehung einer Fibrose unter bestimmten Umständen begünstigt wird. Transgene Mäuse, die KGF in all ihren epithelialen Zellen unter der Kontrolle des starken *Keratin 14*-Promotors exprimieren, weisen eine stark verdickte Epidermis auf, begleitet von Veränderungen der epidermalen Differenzierung (Guo et al., 1993). Allerdings wurde bei diesen Mäusen keine dermale Fibrose beschrieben, was in Anbetracht der Ergebnisse dieser Arbeit unerwartet ist. Es muss jedoch beachtet werden, dass es mehrere Faktoren gibt, die diese fehlende Fibrose erklären könnten. Zum einen verstarben die transgenen Tiere sehr früh nach der Geburt; nur wenige

erreichten das Adultstadium. Ferner wurden nur die „Founder“-Tiere beschrieben und es war keine weitere Zucht und damit auch keine genauere Untersuchungen mehr möglich (persönliche Kommunikation mit Nicole Stokes, Laboratory of Mammalian Cell Biology and Development, The Rockefeller University). Daher ist es nicht möglich vorherzusagen, welche Auswirkungen die KGF-Überexpression für adulte Tiere haben könnte. Auch beim Menschen ist davon auszugehen, dass die verstärkte KGF-Expression erst durch einen weiteren Stimulus wie Trauma bei Keloid-Patienten bzw. Autoimmunreaktionen bei Sklerodermie-Patienten zu Tragen kommt.

Außerdem scheint die Korrelation von Fibrose mit erhöhter KGF-Expression nicht auf alle Gewebe zuzutreffen. In der Lunge scheint KGF sogar einen fibro-protectiven Effekt zu haben. Bei Fibroblasten von Patienten mit idiopathischer Lungenfibrose ist die Fähigkeit zur Expression von KGF vermindert (Marchand-Adam et al., 2005). Zudem wurde in Tierversuchen rekombinantes KGF erfolgreich eingesetzt um vor künstlich induzierter Lungenfibrose zu schützen (Deterding et al., 1997; E S Yi, 1997; Sugahara et al., 1998). Sakamoto *et. al.* konnten kürzlich durch intratracheale Adenovirus-transduzierte KGF-Administration die Ausprägung von Bleomycin-induzierter Lungenfibrose bei Mäusen mildern (Sakamoto et al., 2011). Die Autoren gehen davon aus, dass KGF seine ameliorierende Wirkung auf die Bleomycin-induzierte Lungenfibrose auf vielfältige Weise ausübt: KGF erhöht die Proliferationsrate von alveolären Epithelzellen, was die Reparatur des Lungengewebes verbessert und beseitigt damit den Hauptauslöser der Fibrose. Zudem unterdrückt KGF die Expression von TGF- $\beta$ 1, welches als Induktor der Bindegewebssynthese fungiert. Darüber hinaus vermindert KGF die Oberflächenspannung an der alveolären Luft/Flüssigkeitsgrenzschicht indem es die Sekretion von Tensiden verstärkt (Sakamoto et al., 2011). Die Rolle von KGF in der Fibrogenese der Haut kann durch diese Daten nicht erklärt werden. Es ist allerdings seit langem bekannt, dass es viele Wachstumsfaktoren gibt, welche in verschiedenen Geweben unterschiedliche Reaktionen hervorrufen wie z.B. die Mitglieder der BMP (bone morphogenetic protein)- oder der TGF- $\beta$ -Familie (Alarino und Kallioniemi, 2010). Zudem ist eine künstlich induzierte Lungenfibrose im Tiermodell nur sehr eingeschränkt vergleichbar mit der Situation im humanen System. Im Gegensatz zur Lungenfibrose wird die kutane Fibrose auch nicht auf unvollständige Reparatur des geschädigten Gewebes zurückgeführt, sondern eher auf übermäßige Reparaturmaßnahmen. Außerdem kann KGF auch keinen Einfluss auf die Oberflächenspannung der Haut ausüben. Durch die essentiellen Unterschiede zwischen Bleomycin-induzierter pulmonaler Fibrose in der Maus und kutaner Fibrose im Menschen wird auch die unterschiedliche Rolle von KGF in den verschiedenen Geweben begreiflich.

## 4.2 Der Einfluss von OSM auf die kutane Fibrogenese

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Überstände von Keratinozyten, die mit rekombinantem KGF bzw. den konditionierten Medien von Keloid- und Sklerodermie-Fibroblasten eine aktivierende Wirkung auf Fibroblasten ausüben, stellte sich die Frage über welche Faktoren diese Aktivierung vermittelt wird. Da KGF aufgrund des fehlenden KGF Rezeptors nicht direkt Einfluss auf Fibroblasten nehmen kann und auch die direkte Behandlung von Fibroblasten mit FCMs keine Aktivierung zur Folge hatte, war davon auszugehen, dass es sich um einen oder mehrere Keratinozyten-sekretierte Faktoren handeln muss.

Die Durchführung eines Zytokin-Arrays und dessen Kontrolle mittels Real-time-PCR ergab nur einen Faktor, welcher von Keratinozyten donor-unabhängig auf einen KGF-Stimulus produziert wurde: Oncostatin M (OSM). Die KGF-Abhängigkeit der OSM-Sekretion konnte zweifach bestätigt werden: zum einen mit einer siRNA-Behandlung gegen den KGFR, was die OSM-Expression der Keratinozyten vollständig unterband; zum anderen wurde auch die OSM-Induktion durch Keloid- bzw. Sklerodermie-FCMs unterdrückt, wenn den Medien inhibitorische Antikörper gegen KGF hinzugefügt wurden. OSM ist ein pleiotropes Zytokin der Interleukin-6-Familie, deren Mitglieder eine Vielzahl zellulärer Prozesse wie z. B. Entzündungsreaktionen, Autoimmunität und Krebsentstehung beeinflussen (Silver and Hunter, 2010). Die IL-6 Zytokine binden allesamt an Rezeptorkomplexe, welche immer aus der Rezeptor-Untereinheit Glykoprotein gp130 und einer weiteren Liganden-spezifischen Rezeptor-Untereinheit wie z. B. dem IL-6-Rezeptor, dem LIF(Leukemia inhibitory Factor)-Rezeptor oder dem OSM-Rezeptor besteht. OSM ist ein 28kDa großes Glykoprotein, welches ursprünglich als Inhibitor für Tumorzellwachstum beschrieben wurde. Mittlerweile sind zahlreiche weitere biologische Funktionen von OSM beschrieben worden. Es gilt als Proliferations-Modulator, spielt eine Rolle bei der Embryonalentwicklung, bei Differenzierungsprozessen und Entzündungsreaktionen und ist außerdem an der Regeneration von diversen Geweben beteiligt. Interessanterweise gibt es mehrere Studien die OSM starke profibrotische Eigenschaften zuschreiben: in verschiedenen Gewebetypen stimuliert OSM die Synthese von Pro-Kollagenen durch Fibroblasten und verhindert zudem die spontane Fibroblasten-Apoptose (Scaffidi et al., 2002; Mozaffarian et al., 2008). Lim *et al.* konnten zeigen, dass die OSM-Expression in Kokulturen von Keloid-Keratinozyten und -Fibroblasten hochreguliert ist, während in Kokulturen von normalen Keratinozyten und Fibroblasten keine OSM-Expression gefunden wurde (Lim et al., 2009). Diese Ergebnisse lassen sich mit unseren hier präsentierten Daten hervorragend erklären: Zum ersten Mal konnte gezeigt werden, dass Keratinozyten auf verstärkte KGF-Stimulation mit Sekretion von OSM reagieren, was wiederum zur Aktivierung von Fibroblasten beiträgt. Da der

aktivierende Effekt von KCM:kFCM und KCM:sFCM auf Fibroblasten jedoch stärker ist, als die Wirkung von rekombinantem OSM alleine, muss man davon ausgehen, dass die Keratinozyten als Antwort auf die Behandlung mit konditionierten Medien von Keloid- bzw. Sklerodermie-Fibroblasten noch weitere Faktoren sekretieren, welche sich auf die Kollagen- und FAP-Synthese der Fibroblasten auswirken. Bisher konnten keine weiteren potentiellen Aktivatoren identifiziert werden. Mehrere Erklärungen dafür sind denkbar. Es kann sich um einen oder mehrere Faktoren handeln, die nicht auf dem verwendeten Zytokin-Array vertreten sind. Zudem kann spekuliert werden, dass es sich um Faktoren handelt deren Expression nicht von KGF abhängt, sondern durch weitere Bestandteile der Keloid- bzw. Sklerodermie-Fibroblasten-Überstände induziert wird. Da in dieser Arbeit nur die Überstände von Keratinozyten analysiert wurden, welche direkt mit rekombinantem KGF behandelt wurden, wären solche Faktoren nicht entdeckt worden.

### **4.3 Der Beitrag des STAT3-Signalwegs zur Entstehung von Fibrose**

Obwohl OSM wahrscheinlich nicht der einzige Keratinozyten-sekretierte Faktor ist, der zur Aktivierung dermalen Fibroblasten beiträgt, ist er doch von außerordentlicher Wichtigkeit. Wie gezeigt werden konnte, aktivieren KCM:kFCM und KCM:sFCM in Fibroblasten den STAT3-Signalweg. Diese Phosphorylierung von STAT3 ist direkt abhängig von der Bindung von OSM an seinen Rezeptorkomplex. Ein Beleg dafür ist die Möglichkeit die Aktivierung von STAT3 allein durch rekombinantes OSM auszulösen. Hinzu kommt, dass in Abwesenheit bzw. nach Reduktion von OSM in den KCM mittels neutralisierender Antikörper die STAT3-Phosphorylierung auf das Niveau unbehandelter Fibroblasten gedrückt wird. Durch Inaktivierung des STAT3-Signalwegs mit Hilfe des STAT3-Inhibitors S31-201, wurde auch die Fibroblasten-Aktivierung unterbunden. Durch den Einfluss des STAT3-Signalings auf die Fibroblasten-Aktivität wird auch die Bedeutung von OSM als STAT3-Aktivator unterstrichen.

Es ist bekannt, dass STAT3 eine Rolle bei fibrotischen Erkrankungen spielt. Lim *et. al.* haben bereits berichtet, dass die STAT3-Expression und Phosphorylierung in Keloidgewebe erhöht ist (Lim et al., 2006). Außerdem wurde gezeigt, dass die Menge an phosphoryliertem STAT3 in Kokulturen von Keloid-Fibroblasten und -Keratinozyten am höchsten ist (Lim et al., 2009). Interessanterweise konnten auch Park *et. al.* zeigen, dass die pathologischen Merkmale von Keloid-Fibroblasten durch Einsatz eines STAT3-inhibierenden Phenols aus grünem Tee aufgehoben werden konnten (Park et al., 2008). Kürzlich ist für die diffuse kutane systemische Sklerodermie ebenfalls ein profibrotischer Einfluss des IL-6/STAT3-Signalwegs beschrieben worden (Khan et al., 2012). Auch in vielen anderen Geweben und Krankheitsbildern wurde eine erhöhte STAT3-Aktivierung mit einem profibrotischen Transkriptom und Phänotyp assoziiert.

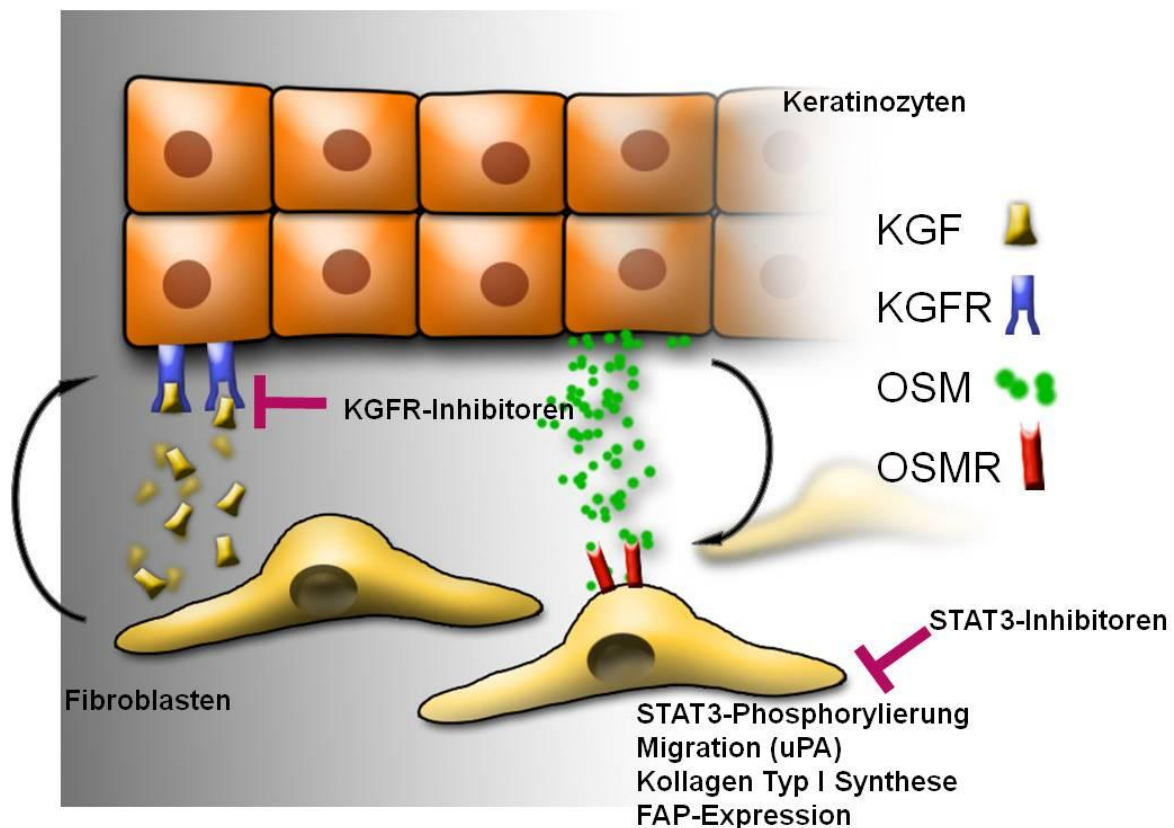
In der Lunge, im Herzen und in der Niere wurde ein fibrosierender Einfluss von STAT3 auf die Fibroblasten beschrieben und eine verminderte Kollagen-Synthese und -Ablagerung nach Inhibierung von STAT3 beobachtet (Pang et al., 2010; Mir et al., 2012; Pechkovsky et al., 2012). Der gp130/STAT3-Signalweg scheint von grundlegender Bedeutung in der Fibrogenese überhaupt zu sein. Fast jede fibrosierende Erkrankung des Bindegewebes der Haut zeigt eine verstärkte Expression und/oder Aktivierung von STAT3. In hypertrophen Narben ist die STAT3-Expression gegenüber normaler Haut erhöht (Cheng et al., 2002) und bei der Graft-versus-host-disease scheint der STAT3-Signalweg eine frühe Rolle zu spielen (Ma et al., 2011).

#### **4.4 Die Rolle des Urokinase-Plasminogen-Aktivatorsystems in fibrosierenden Hauterkrankungen**

Es konnte gezeigt werden, dass die erhöhte Kollagenproduktion und Migration der Fibroblasten über das STAT3-Zielgen Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator (uPA) vermittelt werden. uPA ist eine Serinprotease, die ursprünglich aus Urin isoliert wurde, aber physiologisch auch im Blut und in der extrazellulären Matrix vorkommt. Das Haupts substrat der Urokinase ist Plasminogen, eine zymogene Vorstufe der Serinprotease Plasmin. Aktivierung von Plasmin durch uPA setzt eine Proteolyse-Kaskade in Gang, welche je nach physiologischem Umfeld zur Thrombolyse oder zur Degradation extrazellulärer Matrix beiträgt. Das Urokinase-Plasminogen-Aktivator-System spielt eine wichtige Rolle bei einer Vielzahl biologischer Prozesse wie Zellmigration, Gewebeumbau und Angiogenese. Das uPA-System ist häufig an Gefäßkrankheiten und an der Tumordinvasion und Metastasierung von Krebserkrankungen beteiligt (Kwaan, 1992). Durch seine Fähigkeit zum Abbau von EZM ist das uPA-System auch an der Expansion keloidaler Narben über die Wundränder hinaus beteiligt. Der uPA-Rezeptor (uPAR) ist in der EZM und den Kollagensträngen vieler Keloide stark exprimiert (Leake et al., 2003). Aktuelle Daten weisen auch auf eine Rolle bei der limitierten Form der systemischen Sklerodermie hin, wo uPA die Aktivierung von Zytokinen und die Akkumulation von EZM-Komponenten vermitteln soll (Postiglione et al., 2010). Bei epithelialen Krebszellen, die sowohl KGF als auch den KGFR exprimieren, wurde gezeigt, dass sie über uPA in einer autokrinen, NF-KB-abhängigen Weise die Zellmigration induzieren (Niu et al., 2007). Darüber hinaus haben Strand und Kollegen in Endothelzellen auch die Verbindung zwischen OSM-induzierter uPA-Expression und Zellmigration beschrieben (Strand et al., 2000). Bemerkenswerterweise, beobachteten Tucker *et al.* kürzlich auch, dass uPA die Synthese von Kollagen in pleuralen Mesothelzellen induzieren kann (Tucker et al., 2012).

#### 4.5 Bedeutung der KGF-OSM-induzierten Fibroblasten-Aktivierung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine doppelt-parakrine Feedback-Schleife zwischen Fibroblasten und Keratinozyten in fibrosierenden Erkrankungen der Haut beschrieben. Zum ersten Mal wurde eine erhöhte Expression von KGF durch Keloid- bzw. Sklerodermie-Fibroblasten festgestellt. Es konnte gezeigt werden, dass diese verstärkte KGF Expression in Keratinozyten die Sekretion von OSM und vermutlich noch weiterer Faktoren auslöst, welche wiederum aktivierend auf die dermalen Fibroblasten wirken. Die Aktivierung äußert sich durch eine Zunahme der Kollagen Typ I und der FAP-Expression, sowie durch verstärktes Migrationsverhalten. Es konnte gezeigt werden, dass in Abhängigkeit von OSM der STAT3-Signalweg aktiviert wird. Diese STAT3-Phosphorylierung ist wiederum verantwortlich für die beschriebene Hochregulation der Kollagen-Produktion, so wie für den Anstieg der Fibroblasten-Migration. Im Speziellen konnte die verstärkte Migration auf eine erhöhte Expression des STAT3-Zielgens Urokinase-Plasminogen-Aktivator zurückgeführt werden. Abbildung 37 zeigt eine schematische Darstellung der Ergebnisse dieser Arbeit.



**Abbildung 37. Vereinfachte Darstellung der untersuchten doppelparakrinen Signalschleife und therapeutische Eingriffsmöglichkeiten.**

Keloid- und Sklerodermie-Fibroblasten exprimieren und sekretieren erhöhte Mengen an KGF. Die Keratinozyten, welche den KGFR auf ihrer Oberfläche tragen sind sensitiv für dieses verstärkte KGF-

Signal und reagieren darauf mit starker OSM-Synthese. Die großen Mengen OSM wirken wiederum parakrin auf die Fibroblasten und lösen bei ihnen verstärkte Aktivität aus. Die Fibroblasten reagieren mit verstärkter Expression von FAP und Kollagen Typ I  $\alpha 1$ . Der STAT3-Signalweg wird aktiviert, was zur verstärkten Expression des STAT3-Zielgens uPA führt. uPA ist wiederum für die erhöhte Migration verantwortlich.

Die Bedeutung und Relevanz der erzielten Ergebnisse konnte durch ein *ex vivo* Experiment untermauert werden. Mittels Applikation von rekombinantem KGF auf humane Haut konnte bestätigt werden, dass KGF in der menschlichen Haut eine verstärkte Expression von OSM, Kollagen Typ I  $\alpha 1$ , FAP und uPA induziert. Der nächste Schritt zur Untersuchung und möglichen Ausschöpfung des therapeutischen Potentials der KGF-OSM-Signalschleife wären *in vivo* Analysen. Die Herausforderung besteht darin, ein geeignetes Modell zu finden. Wie unter 4.1 erörtert, stehen die transgenen Mäuse, die KGF in ihren Keratinozyten konstitutiv überexprimieren, als Modellsystem nicht mehr zur Verfügung und sind vor allem aufgrund ihrer kurzen Lebenszeit nicht geeignet. Ideal wäre eine transgene Maus in welcher die Fibroblasten KGF moderat überexprimieren in Analogie zu den Erkenntnissen, die wir im Menschen gewonnen haben. Bei diesen Mäusen würde man eine exzessive keloid-ähnlich Wundheilung erwarten. Außerdem wäre die Untersuchung von Keloid- bzw. Sklerodermie-Mausmodellen auf die Expression von KGF und den therapeutischen Nutzen von KGFR- bzw. STAT3-Inhibitoren von großem Interesse. Wie bereits erwähnt, kommen keloidale Narben natürlicherweise nur beim Menschen vor (Bran et al., 2009) und bisher gibt es kaum Möglichkeiten Keloide in Tiermodellen zu untersuchen. Der Ansatz von Shetlar et al. humane Keloide in das subkutane Gewebe von Nacktmäusen zu implantieren (Shetlar et al., 1985) ist ein Annäherungsversuch, der sich aber in der Praxis nicht durchgesetzt hat (Hillmer et al., 2002). Zur Erforschung einzelner Aspekte der Sklerodermie gibt es drei häufig verwendete Tiermodelle, die zwar nur einen Bruchteil Charakteristika der systemischen Sklerodermie aufzeigen, aber alle eine kutane Fibrose entwickeln. Diese drei sind (1) das Modell der Bleomycin-induzierten Sklerodermie, (2) das Graft-vs.-Host-Disease Modell mit BALB/c-Mäusen als Empfänger und B10.D2-Mäusen als Donor, sowie (3) die transgene Tight-skin (Tsk)-Maus (Clark, 2005; Shibusawa et al., 2008). In diesen drei Mausmodellen könnte man die Expression von KGF und dessen mögliche Auswirkungen in Zukunft untersuchen. Sollte z.B. in der Tsk-Maus oder in Versuchstieren, die Bleomycin-Injektionen erhalten haben, eine erhöhte KGF-Expression detektierbar sein, wäre es von großem Interesse diese Mäuse mit der transgenen KGF-Knockout-Maus (Guo et al., 1996) zu kreuzen und zu ermitteln wie stark die kutane Fibrogenese von KGF abhängt.

Das Ziel dieser Arbeit war die Erforschung des hochkomplexen Fibroblasten-Keratinozyten-Wechselwirkungsspiels. Einige Einzelteile dieses Puzzles wurden bereits in anderen Krankheiten



oder Zelltypen beschrieben. Aus mehreren Studien geht beispielsweise hervor, dass der STAT3-Signalweg in Keloid und Sklerodermie eine Rolle spielt. Unsere Arbeit fügt mehrere dieser Einzelteile zu einem stimmigen Gesamtbild zusammen und ergänzt neue, wichtige Informationen und führt dadurch zu einer innovativen Sichtweise auf die Pathogenese kutaner Fibrose. Seit über drei Jahrzehnten weiß man, dass Wechselwirkungen zwischen dermalen und epidermalen Zellen ausschlaggebend für die Homöostase der Haut sind (Maas-Szabowski et al., 1999). Mit den Ergebnissen dieser Arbeit wird zum ersten Mal die Überexpression von KGF in den mesenchymalen Zellen von Patienten mit fibrosierenden Erkrankungen der Haut und deren Konsequenzen beschrieben. Durch das vorgeschlagene Modell einer doppelt parakrinen Fibroblasten-Aktivierung in der kutanen Fibrose induziert durch eine persistente Hochregulation von KGF werden eine Vielzahl potentieller Zielstrukturen für effiziente Therapieansätze offengelegt und ein besseres Verständnis der dermalen Fibrogenese erzielt.

## 5 Materialien und Methoden

### 5.1 Materialien

#### 5.1.1 Allgemeine Materialien

AppliChem, Darmstadt	Acrylamid-Lösung 40%
BD Discovery Labware Falcon <sup>TM</sup> , Boston, USA	Cell strainer 70/100µm Nylon, Zellkulturflaschen für Keratinozyten (White Plug Seal Cap), Zellkultur- Einwegartikel
Behrens, Hamburg	Agar
Bio-Rad, München	Immun-Blot <sup>TM</sup> PVDF Membran, Precision Plus Protein <sup>TM</sup> Standards Kaleidoscope <sup>TM</sup>
Biozym Scientific GmbH, Oldendorf	Biozym LE Agarose
Braun, Frankfurt am Main	Aqua ad iniectabilia
Carl Zeiss, München	AxioCam, MR Grab Software
Corning Inc., Lowell, USA	Zellkulturflaschen T25, T75, T175, 6-well und 12-well-Platten
Dako, Hamburg	Envision <sup>TM</sup> Detection Systems Peroxidase/DAB
GE Healthcare, Buckinghamshire, England	Amersham ECL Plus Western Blotting Detection System, Amersham Hyperfilm <sup>TM</sup>
Gibco, Grand Island, USA	Dispase <sup>®</sup> aus <i>Bacillus polymyxa</i>
GraphPad Software Inc., USA	GraphPad Prism 4.00 Software

J.T.Baker, Griesheim	Ethanol, Methanol
Langenbrinck Labor- und Medizintechnik, Emmendingen	Glas-Objektträger
Life Technologies Corporation, Carlsbad, USA (früher Invitrogen)	Lipofectamine LTX™ Reagent, Lipofectamin 2000 Reagent, SuperScript™ II Reverse Transcriptase Kit, TrackIt™ 100bp und 1kb DNA Ladder, pcDNA3 Vektor, Topo® TA Cloning Kit
Merck, Darmstadt	Fixierlösung Hemacolor, Farbreagenz rot/blau
Millipore, Eschborn	Einweg-Sterilfilter
New England Biolabs, Ipswich, USA	Restriktionsenzyme mit Puffern, BSA, T4 DNA Ligase, Antarktische Phosphatase, DH-10β kompetente <i>E.coli</i> -Zellen
Omega Bio-Tek, Norcross, USA	e.Z.N.A.® MicroElute® Total RNA Kit
PAA Laboratories Inc., Dartmouth, USA	Dulbeccos Modified Eagle Medium (DMEM), Phosphate Buffered Saline (PBS)
PAN™ Biotech GmbH, Aidenbach	Fötales Kälberserum (FKS), Penicillin/Streptomycin, Amphotericin-B
Pierce/Perino Science, Bonn	BCA Protein Assay Kit
Promega, Heidelberg	Dual-Luciferase® Reporter Assay System, pGL4.10 [luc2] Vektor

PromoCell, Heidelberg	Keratinocyte Growth Medium 2
Qiagen, Hilden	HiSpeed™ Plasmid MIDI Kit, QIAquick® Gel Extraction Kit, siRNAs
R&D Systems, Minneapolis, USA	Quantikine KGF/FGF-7 ELISA
Roche Diagnostics, Mannheim	Taq® -DNA Polymerase, RNase A, dN6 Primer, LightCycler® 480 Multiwell Plates 96, LightCycler® 480 SYBR Green I Master, Ethidiumbromid, XT™ Reagenz
Roth, Karlsruhe	Roti® Load 4x Proteinladepuffer, Rotilabo® Blottingpapier 1,5mm
Serva, Heidelberg	Kollagenase NB4
Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München	Oligonukleotide, BSA, Trypsin, TEMED, DMSO, Ampicillin, SDS, DTT, Tween-20, Bromphenolblau
Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	Superfrost Plus® Objektträger
VWR, Darmstadt	96-Well Platten für BCA Messungen
Whatman International Ltd., Maidstone, England	Whatman 2MM Filterpapier
Zymed Laboratories Inc., San Francisco, USA	BCIP/NBT Substrate Kit

### 5.1.2 Geräte

Bio-Rad Laboratories GmbH, München	Blotapparatur Trans-Blot® SD Semi- Dry Transfer Cell
---------------------------------------	---

	Gelelektrophorese-Apparatur Wide Mini Sub <sup>®</sup> Cell GT
	Spannungsgeräte PowerPac Basic, PowerPac HC
Bühler, Edmund, Tübingen	Schüttler SM25
Braun, Frankfurt am Main	Aqua ad iniectabilia
Carl Zeiss, Jena	Mikroskope Axiovert 10, Axiovert 200
Eppendorf, Hamburg	Thermomixer 5436, Thermomixer Comfort, Thermomixer Compact Zentrifuge MiniSpin Plus, Centrifuge 5810R
GE Healthcare Life Science, Freiburg	Spannungsgeräte Electrophoresis Power Supply 301 und 1001
Heidolph, Kelheim	Magnetrührer MR 2000, MR 2002, Vortexer REAX 2000
Heraeus, Hanau	Zellinkubator CO <sub>2</sub> -Auto Zero, Begasungsbrutschrank BB6220, CO <sub>2</sub> -Inkubator HeraCell 240 Sterilbank LaminAir HB 2448, HeraSafe KS18 Biofuge 13, Biofuge 22R, Megafuge 1.0
IKA-Labortechnik, Staufen	Schüttler IKA-Vibrax VXR
Leica Microsystems CMS GmbH, Bensheim	DM IL Type 090-135.001
MJ Research, Waltham, USA	Peltier Thermal Cycler PTC-200

MWG Biotech, Ebersberg	ELISA-Reader Emax, Geldokumentationssystem 2001i
Peqlab Biotechnologies GmbH, Erlangen	Spektralphotometer Nanodrop® ND- 1000-UV/Vis
Roche Diagnostics, Mannheim	Real-Time-PCR-Gerät LightCycler® 480
Roth, Karlsruhe	Roti® Load 4x Proteinladepuffer
Sartorius, Göttingen	Waagen R160P, L2200S
Savant, New York, USA	Speedvac Concentrator SC 110
Tecnorama, Fernwald	Autoklav FNR 9325E
WTW, Weilheim	pH-Meter pH522

### 5.1.3 Bakterien

NEB 10-beta Competent *E. coli* (High Efficiency) Zellen: Stamm K12, DH10 $\beta$ <sup>TM</sup>-Derivat, New England Biolabs, USA

One shot® TOP10 chemically competent *E.coli*-Zellen, Life Technologies, USA (Invitrogen<sup>TM</sup>)

### 5.1.4 Vektoren

pCRII®-TOPO®

Das PCR-Produkt der kodierende Sequenz von KGF wurde ohne zusätzliche Zwischenschritte direkt in den pCRII®-TOPO ligiert.

pCMX-PL1

Der pCMX-PL1 Vektor besteht aus den klassischen Vektoren pUC 19 und CDM8. Der in den Vektor integrierte CMV-Promotor und wurde zur Überexpression von KGF in Fibroblasten bzw. Keratinozyten verwendet.

### 5.1.5 Primäre Zellen

Normale humane dermale	2F0621, 3F0379, 9F0438, 9F0889
------------------------	--------------------------------

## Fibroblasten (Chambrex)

Normale Fibroblasten selbst  
isoliert

NF 25-106

Dermale Fibroblasten isoliert  
aus Keloiden

K00C06B/1b, K00C02/3a,  
K00C01/3a, Kel 8.8.08, Kel 6.4.95, Kel  
9.2.07

Dermale Fibroblasten isoliert  
aus zirkumskripter Sklerodermie

Z00C06B/1b, Z00C06B/1a,  
Z11M06/2a, Z11C14ea

Dermale Fibroblasten isoliert  
aus systemischer Sklerodermie

S00T03/1b, S480071/2b

Normale humane epidermale  
Keratinozyten selbst isoliert

NK 32-106

### 5.1.6 Humane Gewebeproben

Gesunde Haut-Proben zur Zellisolation, die ex vivo Experimente und die Einbettung in Paraffin wurden vom Derma-OP-Team des Uniklinikums Regensburg zur Verfügung gestellt. Formalin-fixiertes Paraffinmaterial von humanem Keloid- und Sklerodermie-Gewebe wurde von der Gewebebank des Institutes für Pathologie und aus dem Archiv des Instituts für Dermatologie bezogen. Die Verwendung des Patientenmaterials erfolgte unter Einhaltung der Richtlinien der Ethikkommission des Uniklinikums Regensburg.

### 5.1.7 Antikörper

Primäre Antikörper	Firma
anti-FGF 7 (rabbit)	Santa Cruz, USA
anti-STAT3 (mouse)	Cell Signaling, Danvers, USA
anti-p (Y705) STAT3 (rabbit)	Cell Signaling, Danvers, USA
β-Actin (mouse)	Sigma Aldrich

Sekundäre Antikörper	
anti-mouse (AP-konjugiert)	Cell Signaling, Danvers, USA
anti-rabbit (AP-konjugiert)	Cell Signaling, Danvers, USA

### 5.1.8 Rekombinante Proteine und Inhibitoren

Proteine bzw. Inhibitor	Bezugsquelle
Keratinocyte Growth Factor (KGF)	Humanzyme
Oncostatin M (OSM)	R&D Systems
S3I-201 (STAT3-Inhibitor)	Sigma Aldrich

### 5.1.9 Oligonukleotide

Gen	Primer für Real-Time PCR-Analysen
Keratinocyte Growth Factor (KGF)	5'-AAACAGCGTCACAGCAACTG-3' 5'-GTAGTGCTCCGGGTGTTTCAT-3'
Collagen type I $\alpha$ 1 (Col I $\alpha$ 1)	5'-CGGCTCCTGCTCCTCTT-3' 5'-GGGGCAGTTCTTGGTCTC-3'
Oncostatin M (OSM)	5'-GGCCACGCGGGACCGACTTT-3' 5'-GGGGCAACGGCCCTGCAAGT-3'
Fibroblast activation protein (FAP)	5'-CGGCCCAGGCATCCCCATTT-3' 5'-CACTCTGACTGCAGGGACCACC-3'
Urokinase Plasminogen Activator (uPA)	5'-TGCGTCCTGGTCGTGAGCGA-3' 5'-CCGGCCCATGGTGTCAGTGC-3'
$\beta$ -Actin	5'-CTACGTCGCCCTGGACTTTCGAGC-3' 5'-GATGGAGCCGCCGATCCACACGG-3'

### 5.1.10 Small interfering RNAs

Zum Knock-down der jeweiligen Gene wurden Flexi-Tube siRNAs von QIAGEN verwendet.

Ziel-mRNA	siRNA
KGF (FGF-7)	Hs_FGF7_8 FlexiTube siRNA SI03064663 Hs_FGF7_10 FlexiTube siRNA SI03110163



## KGFR (FGFR2)

Hs\_FGFR2\_6 FlexiTube siRNA SI02665299  
Hs\_FGFR2\_12 FlexiTube siRNA SI04380649

## uPA (PLAU)

Hs\_PLAU\_6 FlexiTube siRNA SI02662135  
Hs\_PLAU\_7 FlexiTube siRNA SI02662674

### 5.1.11 Medien

Fibroblasten-Medium

DMEM mit 10% FKS, 1%  
Penicillin/Streptomycin, ggf.  
Amphotericin

Keratinozyten-Medium

Keratinocyte Growth Medium 2, mit  
Supplement-Mix, 1% Penicillin/  
Streptomycin, ggf. Amphotericin

Einfriermedium für Fibroblasten

25ml DMEM, 15ml FKS, 5ml DMSO

### 5.1.12 Puffer und Lösungen

#### Lösungen zur Plasmidisolation

Lösung I

50mM Glukose, 25mM Tris/HCl  
(pH8,0), 10mM EDTA

Lösung II

0,2M NaOH, 1%SDS

Lösung III

60ml KOAc (5M), 11,5ml Eisessig,  
28,5ml H<sub>2</sub>O

TAE-Puffer 50x zur

Agarosegelelektrophorese

2M Tris/Acetat (pH 8,0), 50mM  
EDTA

Agarosegel 0,5-2%

0,5 -2g Agarose/ 100ml TAE 1x

DNA-Ladepuffer 4x

0,25%Bromphenolblau, 40%  
Saccharose, 0,25% Xylencyanol

Ethidiumbromid-Lösung

0,04% EtBr in ddH<sub>2</sub>O

RIPA-Puffer zur Extraktion von Gesamtprotein	50mM Tris/HCl (pH 7,5), 150mM NaCl, 1% Nonidet® P40, 0,5% Natriumdesoxycholat, 0,1% SDS, Proteaseinhibitoren (Roche)
Elektrophoresepuffer für SDS-PAGE	25mM Tris/HCl (pH 8,5), 200mM Glycin, 0,1% SDS
PA-Sammelgel (4%)	375µl 40%ige Acrylamidlösung, 450µl Tris/HCl (1M, pH 6,8), 2,85ml H <sub>2</sub> O, 37,5µl 10%ige SDS-Lösung, 25µl APS, 3,5µl TEMED
PA-Trenngel (7,5%)	375µl 40%ige Acrylamidlösung, 450µl Tris/HCl (1M, pH 8,8), 2,85ml H <sub>2</sub> O, 100µl 10%ige SDS-Lösung, 50µl APS, 10µl TEMED
Western Blot Transferpuffer	10% Methanol, 25mM Tris, 190mM Glycin
TBS-Puffer	50mM Tris/HCl (pH 7,5), 150mM NaCl
TBST-Puffer	TBS-Puffer mit 0,1% Tween20
Blockingpuffer	5% BSA bzw. Milchpulver in TBST
RNAse A –Lösung	10mM Tris/HCl (pH 7,0), 10mg/ml RNAse A
HEPES-Puffer	40g NaCl, 1,5g KCl, 11,9 g HEPES, 10g Glukose, add 500ml ddH <sub>2</sub> O, pH 7,55
Hepes-Agar	455ml ddH <sub>2</sub> O, 5g Agar, 5ml Penicillin/Streptomycin, 55,6ml HEPES-Puffer

## 5.2 Methoden

### 5.2.1 DNA-Analytik

#### 5.2.1.1 Isolation genomischer DNA

Die Isolierung von genomischer DNA aus Zellen bzw. aus nativem Gewebe wurde mit Hilfe des QIAamp DNA Mini Kits (Firma Qiagen, Hilden) nach der Vorgabe des Herstellers durchgeführt. Die Elution der genomische DNA erfolgte mit 100µL AE-Puffer.

#### 5.2.1.2 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentration gelöster genomischer oder Plasmid-DNA wurde durch UV-Absorption bei einer Wellenlänge von 260nm mittels eines Photometers bestimmt.

#### 5.2.1.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur Amplifikation der CDS (kodierenden Sequenz) von KGF vom Start- bis zum Stop-Codon (585nt) wurde eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) in 50µl Ansätzen durchgeführt. Pro Ansatz wurden 5µl PCR-Puffer (10x), 0,5 µl dNTPs (je Nukleotid 10mM), 1µl forward Primer (20µM; 5'-ATGCACAAATGGATACTGAC-3'), 1µl reverse Primer (20µM; 5'-TTAAGTTATTGCCATAGGAAG-3'), 1µl cDNA aus normalen Fibroblasten und 0,5µl Taq-DNA-Polymerase (5U/µl) eingesetzt. Mit ddH<sub>2</sub>O wurde auf ein Gesamtvolumen von 50µl aufgefüllt. Die PCR-Reaktion wurde im Thermocycler standardmäßig unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Initialer Denaturierungsschritt	95°C	5 min
Denaturierung	95°C	30 sec
Primer-Annealing	63°C	25 sec
Elongation	72°C	40 sec
Finaler Elongationsschritt	72°C	5 min

Die Annealing-Temperatur wurde unter Berücksichtigung der Schmelzpunkte der verwendeten Primerpaare berechnet. Pro PCR-Reaktionen wurden mit 40 Amplifikationszyklen durchgeführt. Jeder Zyklus enthält die drei Schritte Denaturierung, Primer-Annealing und Elongation. Die Proben wurden anschließend bei 4°C gelagert und mittels Agarose-Gelelektrophorese ausgewertet.

#### **5.2.1.4 Agarose-Gelelektrophorese**

Die Trennung von Nukleinsäure-Fragmenten nach Größe wurde mittels Gelelektrophorese durchgeführt. Je nach erwarteter Größe des DNA-Fragments wurden 0,8-2%ige Agarosegele hergestellt und ein 100bp bzw. 1kb DNA-Standard verwendet. Die DNA-Proben wurden mit Ladepuffer im Verhältnis 1:4 vermischt und in die Geltaschen hineinpipettiert. Die Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 80-100 Volt. Zur Visualisierung der Gelbanden wurde das Gel 5-30 min in einer 0,04%igen Ethidiumbromid-Lösung inkubiert und dann auf einem UV-Schirm fotografiert.

#### **5.2.2 Klonierungen des KGF-Expressionskonstrukts**

Die kodierende Sequenz (CDS) von KGF (585nt) wurde mittels PCR amplifiziert und dann zunächst in den pCRII-TOPO-Vektor hineinligiert. Im Anschluss wurde die KGF-CDS in Expressionsvektor pCMX-PL1 umklont:

##### **5.2.2.1 TOPO-Cloning**

Das TOPO<sup>®</sup> TA Cloning<sup>®</sup>-System (Invitrogen<sup>™</sup>) wird verwendet um PCR-Produkte direkt im Anschluss an die PCR-Reaktion zu klonieren. Der pCR<sup>®</sup>II-TOPO<sup>®</sup>-Vektor hat 3'-T-Überhänge und kovalent gebundene Topoisomerase-I und kann so taq-amplifizierte PCR-Produkte direkt ligieren. Zur Klonierung der KGF-CDS wurden gemäß den Herstellervorgaben 2µl PCR-Produkt, 1µl Salz-Lösung (aus dem Kit) mit 2µl Wasser auf ein Gesamtvolumen von 5µl aufgefüllt. Nach Zugabe von 1µl pCR<sup>®</sup>II-TOPO<sup>®</sup>-Vektor wurde der Ansatz vorsichtig gemischt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurden 2µl der Mischung unter Beachtung des Kit-Protokolls in kompetente One shot<sup>®</sup> TOP10 *E.coli*-Zellen transformiert.

##### **5.2.2.2 Restriktionsverdau**

Zur DNA-Spaltung wurden Restriktionsendonukleasen mit dem passenden Puffersystem von NEB verwendet. Zum Restriktionsverdau für die Klonierung des KGF-Expressionskonstrukts wurden die Enzyme XhoI und HindIII benutzt. Für einen 10µl-Ansatz wurden 200ng-1µg Plasmid-DNA verwendet, 5U pro benötigtem Enzym und 1µl des passenden 10x-Puffers. Die Ansätze wurden 1-2h bei der empfohlenen Reaktionstemperatur inkubiert. Das Restriktionsverdau-Ergebnis wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese kontrolliert.

##### **5.2.2.3 Ligation**

Zur Klonierung des Expressionsplasmids wurde mit den gleichen Restriktionsenzymen geschnittener Vektor und Insert im Verhältnis 1:3-5 zusammengegeben. Pro Reaktionsansatz

wurden also 0,3µg Vektor mit 1-1,5µg Insert, 2µl T4 DNA Ligase-Puffer und 400U T4 DNA-Ligase mit ddH<sub>2</sub>O auf 20µl aufgefüllt. Die Ligationsreaktion erfolgte entweder für 2h bei Raumtemperatur oder bei 16°C über Nacht. Im Anschluss konnte der Ligationsansatz zur Transformation verwendet werden.

#### **5.2.2.4 Transformation**

Die Plasmid-DNA wurde per Hitzeschock in die kompetenten Zellen transformiert. Dazu wurden die Cups mit den NEB 10-beta kompetenten *E. coli* Zellen 10min auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden 100ng Plasmid in einem Volumen von 1-5µl hinzugefügt und dann das Reaktionsgefäß zum Mischen der DNA mit den Zellen 4-5 Mal mit dem Finger angeschnippt. Danach wurden die Ansätze 30min in Ruhe auf Eis inkubiert. Daraufhin folgte der 30-sekündige Hitzeschock bei 42°C und eine erneute Inkubation auf Eis für 5min. Im Anschluss wurden 950µl zimmerwarmes SOC-Medium (NEB, USA) zu der Zellmischung gegeben und der ganze Ansatz dann 1h bei 37°C geschüttelt. Die Bakterien wurden daraufhin 4min bei 4000rpm zentrifugiert, der Überstand wurde bis auf 100µl verworfen und das Zellpellet in den restlich 100µl resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde schließlich auf vorgewärmten Agarplatten mit Ampicillin als Selektionsantibiotikum ausplattiert und 12-16h bei 37°C inkubiert.

#### **5.2.2.5 Isolierung von Plasmid-DNA**

Für die Isolation der Plasmid DNA aus Bakterienkulturen wurde das Prinzip der alkalischen Lyse angewendet. Nach erfolgreicher Transformation wurden pro Platte 8-12 Einzelkolonien gepickt und mit jeder Einzelkolonie wurden jeweils 3ml steriles LB-Medium mit Ampicillin (1:500) angeimpft. Nach 16h Schütteln bei 37°C wurden die Bakterienkolonien 4min bei 4000rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in 100µl der Lösung I resuspendiert. Zur Lyse der Bakterien wurde nach 5 Minuten Inkubation auf Eis 200µl Lösung II hinzugegeben und dabei das Gefäß vorsichtig geschwenkt. Dieser Schritt ermöglicht die spätere Abtrennung der Plasmid DNA von Proteinen und chromosomaler DNA. Das in Lösung II enthaltene SDS denaturiert die Proteine, das alkalische Milieu zerstört die chromosomale DNA. Anschließend wurden dem Ansatz 150µl Lösung III zugegeben und fünf Minuten auf Eis inkubiert. Durch die darauf folgende fünfminütige Zentrifugation bei 13000rpm wurden denaturierte Proteine, hochmolekulare RNA und chromosomale DNA entfernt. Der Überstand mit der enthaltenen Plasmid DNA wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 900µl reinem Ethanol gefällt. Dazu wurde der Ansatz 10min auf Eis inkubiert und anschließend 10min bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet bei 37°C getrocknet. Anschließend

wurde das Pellet in 10µl eines H<sub>2</sub>O/RNase Mixes (120µl H<sub>2</sub>O + 5µl RNase) resuspendiert und 20min bei 37°C geschüttelt, um störende RNA zu entfernen.

Für die Plasmid Midi-Präparation wurden 50ml steriles LB Medium mit Ampicillin als Selektionsantibiotikum versetzt, mit 50µl Bakteriensuspension aus einer Mini-Vorkultur angeimpft und über Nacht bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. Die Plasmidisolierung erfolgte mit dem HiSpeed™ Plasmid Midi Kit der Firma Qiagen nach Angaben des Herstellers nach dem gleichen Prinzip wie die Mini-Präparation.

Die Plasmid DNA wurde mit 800µl ddH<sub>2</sub>O eluiert und bei 4°C bzw. -20°C gelagert.

### **5.2.3 RNA-Analytik**

#### **5.2.3.1 Isolierung von Gesamt-RNA**

Die Isolierung von RNA wurde nach dem Protokoll des E.Z.N.A.<sup>®</sup> Total RNA Kit I (Omega Bio-Tek) durchgeführt. Zur RNA-Isolation wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit einer Trypsin/EDTA-Lösung (0,05% bzw. 0,02% (w/v)) von der Zellkulturschale gelöst und anschließend pelletiert. Das Zellpellet wurde in Lysispuffer resuspendiert und die RNA wurde nach dem Kit-Protokoll isoliert. Zur Isolation von RNA aus humanem Gewebe wurden die Hautstückchen mit flüssigem Stickstoff gefroren und mit einem Mörser mechanisch zerrieben. Das pulverisierte Gewebe wurde mit dem Lysis-Puffer aus dem E.Z.N.A.<sup>®</sup> Total RNA Kit I zu einer Zellsuspension verarbeitet. Die Isolierung der RNA erfolgte anschließend nach Angaben des Herstellers. Die RNA wurde in 30µL RNase freiem ddH<sub>2</sub>O eluiert und bei -80°C gelagert. Vor der reversen Transkription wurde die Konzentration von allen RNA-Proben im Nanodrop<sup>®</sup> Spektralphotometer (Firma Peqlab, Erlangen) vermessen.

#### **5.2.3.2 Reverse Transkription (cDNA-Synthese)**

Pro Reaktionsansatz wurden 500ng RNA, 4µL First Strand Puffer (5x), 2µL DTT (0,1 M), 1µL dNTPs (10mM) und 1µL dN6-Primer (Random Hexamer Primer, 2mg/mL) eingesetzt und mit ddH<sub>2</sub>O auf 19µL Gesamtvolumen aufgefüllt. Zur Denaturierung der RNA-Moleküle wurde die Reaktionslösung für 5min bei 70°C inkubiert. Nach der Zugabe von 1µL Superscript II Reverse Transkriptase, wurde der Reaktionsansatz eine Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die reverse Transkriptase durch eine 10-minütige Inkubation bei 70°C inaktiviert. Durch Zugabe von je 1µL RNase A-Lösung und einer 20-minütigen Inkubation bei 37°C wurden die verbliebenen RNA-Moleküle abgebaut. Die cDNA wurde bei -20°C gelagert.

### 5.2.3.3 Semiquantitative Real-time PCR

Um die Expressionsstärke spezifischer mRNAs zu quantifizieren, wurde eine Real-Time (RT)-PCR unter Verwendung des LightCycler® 480 Systems durchgeführt. Diese Methode ermöglicht eine Quantifizierung der amplifizierten cDNA-Menge mit Hilfe des interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffes SYBR® Green. Pro Ansatz wurde 1µl cDNA eingesetzt. Außerdem wurden jedem Reaktionsansatz 0,5µL je Primer (20µM), 8µL ddH<sub>2</sub>O und 10µL LightCycler® 480 SYBR Green I Master zugegeben. Die Primer wurden so gewählt, dass die Annealing-Temperatur 60°C betrug. Die Amplifikation wurde in 40-45 Zyklen durchgeführt. Zur Quantifizierung wurde  $\beta$ -Aktin bei jedem Lauf als Haushaltsgen mitgeführt. Die Analyse erfolgte mit der zugehörigen Software nach Vorgabe des Herstellers.

Die RT-PCR wurde nach folgendem Programm durchgeführt:

Initialer Denaturierungsschritt	95°C	10 min
Denaturierung	95°C	10 sec
Primer-Annealing	60°C	10 sec
Elongation	72°C	20 sec
Messtemperatur	76-90°C	

### 5.2.4 Protein-Analytik

#### 5.2.4.1 Herstellung zellulärer Gesamtproteinextrakte

Zur Herstellung von Gesamtproteinextrakten wurden die gewünschten Zellen mit PBS gewaschen, aus der Zellkulturflasche geschabt und durch einen Zentrifugationsschritt (3000rpm, 5min) pelletiert. Das Zellpellet wurde daraufhin mit 200µl RIPA-Puffer resuspendiert und bei 4°C für 15min auf einem Schüttler inkubiert. Durch einen weiteren Zentrifugationsschritt (13000rpm, 10min, 4°C) sammelten sich die unlöslichen Zellbestandteile im Pellet, während die Protein im Überstand blieben. Die Proteinlysate wurden in frische Reaktionsgefäße überführt und bei -20°C gelagert.

#### 5.2.4.2 Protein-Quantifizierung nach Bradford

Die Konzentration der Proteinlysate wurde mittels des BCA Protein Assay Kits (Thermo Scientific) nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Das Prinzip des Kits basiert darauf, dass die Peptidbindungen der Proteine Cu<sup>2+</sup>-Ionen alkalisch zu Cu<sup>+</sup>-Ionen reduzieren, was mit einem Farbwechsel von grün zu lila einhergeht. Durch den violetten Farbkomplex, den die Cu<sup>+</sup>-Ionen mit Bicinchonsäure (BCA) bilden, kann die Proteinkonzentration photometrisch bei

562nm vermessen werden. Die Messung wird in einer 96-Well Platte durchgeführt, wobei pro well auf 5µl Proteinlysate 200µl alkalische BCA-Kupfer (II)-Lösung gegeben werden. Zur Quantifizierung wird bei jeder Messung als Standard eine BSA-Verdünnungsreihe mitgeführt. Die Reduktion der  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen erfolgt innerhalb von 15min bei Raumtemperatur, woraufhin die Absorptionsmessung in einem ELISA-Reader durchgeführt wird. Die Konzentrationsbestimmung erfolgt für jedes Proteinlysate im Doppelansatz.

#### **5.2.4.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Mittels SDS-PAGE wurden die Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Je nach Größe des Proteins, das analysiert werden soll, werden 5-15%-ige Polyacrylamidgele hergestellt (7,5% für Proteine von 35-200kDa). Pro Probe wurden 40µg Gesamtprotein mit denaturierendem Roti-Load-Auftragspuffer versetzt und bei 70°C für 10min inkubiert. Anschließend wurden die Proben und ein kommerzieller Proteinstandard auf das Gel aufgetragen und 2,5h bei einer Spannung von 80V aufgetrennt.

#### **5.2.4.4 Western Immunoblot**

Zum Nachweis STAT3 und phospho-STAT3 in Gesamtproteinextrakten wurden diese nach der Auftrennung mittels SDS-PAGE auf eine PVDF-Membran transferiert und darauf mithilfe eines spezifischen Antikörpers nachgewiesen. Zu diesem Zweck wurde das Polyacrylamidgel für 15 min in Transferpuffer äquilibriert. Die PVDF-Membran wurde für je 5min in Methanol und anschließend in Transferpuffer inkubiert. Der elektrophoretische Transfer erfolgte anschließend 45 min lang bei konstanten 15 V Spannung. Zur Sättigung unspezifischer Bindestellen wurde die Membran 1h bei Raumtemperatur mit dem jeweiligen Blockingpuffer (5% Milchpulver oder BSA in TBST) inkubiert. Die Inkubation mit dem spezifischen primären Antikörper erfolgte in der geeigneten Verdünnung im jeweiligen Blockingpuffer über Nacht bei 4°C. Nach dreimaligem Waschen mit TBST für jeweils 5 min wurde die Membran mit einem AP-konjugierten, gegen den konstanten, spezies-spezifischen Teil des primären Antikörpers gerichteten sekundären Antikörper für 1h bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert. Nach drei weiteren zehnminütigen Waschschritten mit TBST erfolgte die Detektion von spezifischen Banden unter Verwendung des Substrates für die Alkalische Phosphatase (BCIP/NBT Substrate Kit) innerhalb von 10min bis 4h.

#### **5.2.4.5 Immunhistochemie**

Frische Schnitte von in Paraffin eingebetteten Gewebe-Blöckchen von gesunden Individuen und Keloid- bzw. Sklerodermie-Patienten wurden eine Stunde im Wärmeschrank bei 72°C inkubiert,



mit Xylol entparaffiniert und im Anschluss mittels einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert. Im Schnellkochtopf wurden die Schnitte für 5min in Tris/EDTA-Puffer (pH 9,0) bei 120°C vorbehandelt. Zur Blockierung der endogenen Peroxidasen wurde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> verwendet. Im Anschluss wurden die Schnitte erst 30min mit dem entsprechenden primären Antikörper und dann 30min mit dem passenden sekundären Antikörper inkubiert. Antikörperbindung wurde durch Färbung mit DAB(+)-Lösung (Dako) sichtbar gemacht. Zusätzlich wurden die Zellkerne mit Hämalaun blau gegengefärbt. Die Etablierung und Durchführung der immunhistochemischen Färbungen wurden von Rudolf Jung (MTA, Institut für Pathologie, Universität Regensburg) übernommen.

#### **5.2.4.6 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)**

Die Bestimmung der KGF-Proteinkonzentration in Fibroblasten-Überständen bzw. Patientenseren wurde mit dem KGF-ELISA von R&D durchgeführt. Die Messung von OSM-Protein in den Überständen behandelter und unbehandelter Keratinozyten erfolgte mithilfe des OSM-ELISAs der Firma RayBioTech. Beide Assays wurden exakt nach den Vorgaben der Hersteller durchgeführt.

### **5.2.5 Zellkultur-Methoden**

#### **5.2.5.1 Isolierung humaner Fibroblasten und Keratinozyten**

Fibroblasten und Keratinozyten wurden in einer Sterilbank nach folgendem Protokoll aus adulten Hautproben isoliert: Mit sterilen Scheren und Skalpellen wurde Fett- und Gefäßgewebe von den Hautstücken entfernt. Daraufhin wurden diese in ca. 2mm<sup>2</sup> große Stückchen zerschnitten und über Nacht bei 4°C in einem 50ml Falcon mit Dispase II-Lösung (1mg/ml; Gibco) inkubiert. Nachdem Dispase-Verdau konnte bei den einzelnen Stückchen die Dermis leicht von der Epidermis getrennt werden.

Um die Fibroblasten aus der Dermis zu lösen, wurde die Dermisstückchen 4h bei 37°C in einer Kollagenase NB4-Lösung (0,25U/ml; Serva) inkubiert. Anschließend wurde die Fibroblasten-Kollagenase-Mischung über ein Sieb mit 70µm-Porengröße geschüttet, 4min bei 1200rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in DMEM resuspendiert, die Zellen gezählt und in einer Dichte von 400.000 Zellen pro T75-Zellkulturflasche (Corning) ausgesät.

Zur Isolation der Keratinozyten aus der Epidermis, wurden die Epidermisstückchen 30min bei 37°C in einer 0,25%-igen Trypsin/EDTA-Lösung inkubiert. Im Anschluss wurde das Gemisch über ein Sieb mit 100µm-Porengröße bereinigt, 4min bei 1200rpm zentrifugiert und der

Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in Keratinocyte Growth Medium 2 resuspendiert und in einer Dichte von 500.000 Zellen pro T75- Zellkulturflasche (BD Falcon) ausgesät.

#### 5.2.5.2 Kultivierung humaner Fibroblasten und Keratinozyten

Die Fibroblasten wurden in DMEM kultiviert welches mit Penicillin (400U/ml), Streptomycin (50mg/ml) und 10 %FKS versetzt war. Alle 5 Tage wurden die Zellen 1:3 gesplittet.

Die Keratinozyten wurden in Keratinocyte Growth Medium 2 gehalten. Neben den genannten Antibiotika wurde dem Medium zusätzlich noch Amphotericin B (2,5µg/ml) als Antimykotikum beigelegt. Gesplittet wurde nach Bedarf; durchschnittlich nach 3 Tagen 1:2.

#### 5.2.5.3 Transiente Transfektion primärer Zellen

Die Transfektion von siRNAs wurde mit dem Lipofectamin 2000 –Reagenz durchgeführt, während Plasmide mit Lipofectamin LTX transfiziert wurden. Der Transfektionsvorgang wurde nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Die Transfektionseffizienz wurde mittels RT-PCR kontrolliert.

#### 5.2.5.4 Behandlung mit rekombinanten Proteinen und Inhibitoren

Die Keratinozyten wurden für verschiedene Anwendungen mit rekombinantem KGF und die fibroblasten mit rekombinantem OSM bzw. dem STAT3 Inhibitor S3I-201 behandelt. Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die Behandlungszeiten und –Konzentrationen.

Protein bzw. Inhibitor	Behandelter Zelltyp	Konzentration	Inkubationszeit	Folgende Anwendung
<b>KGF</b>	Keratinozyten	25ng/ml	24h	Zytokin Array
<b>KGF</b>	Keratinozyten	25ng/ml	8h bzw. 24h	Real-time PCR
<b>OSM</b>	Fibroblasten	10ng/ml	15min	Western Blot
<b>OSM</b>	Fibroblasten	10ng/ml	8h bzw. 24h	Real time PCR Scratch-Assay
<b>S3I-201</b>	Fibroblasten	100µM	16h	Real time PCR Scratch-Assay

#### 5.2.5.5 Migrations-Assay (Scratch-Assay)

Das Migrationsverhalten der humanen dermalen Fibroblasten wurde mithilfe des Scratch-Assays untersucht. Dazu wurden die Zellen in hoher Dichte in 6-Well-Platten ausgesät (200.000 Zellen/Well). Nach 24h wurde mit einer Plastikpipettenspitze ein senkrechter Strich in die Zellschicht gekratzt. Die Migration der Zellen in diesen Bereich wurde per Mikroskop nach 12h und nach

24h gemessen. Die absolute Migration nach 12 und 24h wurde in  $\mu\text{m}$  angegeben. Bei jeder Analyse wurden Doppelansätze verwendet.

#### **5.2.5.6 Proliferations-Assay (XTT)**

Das Proliferationsverhalten der Fibroblasten wurde mit dem XTT Zellproliferations-Kit (Roche) untersucht. Zur Durchführung des Assays wurden die Zellen in verschiedenen Zellzahlen (1.000 oder 2.000 Zellen pro Well) in eine 96-Well Platte (insgesamt 4 Platten) in dreifach Ansätzen in DMEM (ohne Phenolrot) ausgesät. Die Platten wurden 24h bei 37°C und 8% CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden pro well 50 $\mu\text{l}$  XTT Reagenz zugesetzt. Die Stoffwechselleistung aktiver Zellen wurde durch die Reduktion bzw. Spaltung eines Tetrazolium-Salzes (XTT labeling reagent) zu einem Formazan-Salz, in der Gegenwart eines Elektronen-Akzeptors (electron coupling reagent), bestimmt. Proportional zu der Reduktion erfolgte ein Farbumschlag der Reagenzien von gelb nach orange, welcher im ELISA Reader bei 490nm nach 2h gemessen wurde. Anschließend erfolgte eine weitere 2 stündige Inkubation im Brutschrank, bevor die Proben erneut vermessen wurden. Die Zugabe der Reagenzien und die Vermessung wurden in den 3 folgenden Tagen analog mit den weiteren Platten wiederholt.

#### **5.2.5.7 Durchführung des humanen Zytokin-Arrays**

Zur Identifikation KGF-regulierter Zytokine in den Überständen von humanen Keratinozyten wurde der RayBio Cytokine Array V (RayBiotech, Inc., Norcross, GA) benutzt. Gemäß dem Protokoll des Herstellers wurden die Array-Membranen erst in Blockingpuffer und dann 1,5h mit den unverdünnten Überständen behandelte bzw. unbehandelte Keratinozyten inkubiert. Anschließend wurden die Membranen gewaschen und dann erst 1,5h mit Biotin-konjugierten Antikörpern und daraufhin 2h mit HRP (Horseradish Peroxidase)-konjugiertem Streptavidin inkubiert. Als nächstes wurden die Membranen in Detektionspuffer inkubiert und dann auf einen Röntgenfilm aufgelegt. Zuletzt wurde auf den Scans des Röntgenfilms mittels Photoshop die Pixeldichte der einzelnen Zytokin-Spots bestimmt.

#### **5.2.6 Statistische Auswertung**

Sämtliche Ergebnisse wurden als Mittelwert bzw. prozentualer Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung dargestellt. Der statistische Vergleich von zwei Gruppen wurde mit Hilfe des ungepaarten t-Tests ermittelt, wenn  $n > 5$  und die Daten normalverteilt waren. Bei  $n < 5$  wurde der Mann-Whitney-Test herangezogen. Zum Vergleich von drei oder mehr Gruppen wurde eine ANOVA (Analysis of Variance) durchgeführt mit dem Tuckey Post-hoc-Test bei  $n > 5$  und Normalverteilung der Daten

bzw. dem Kruskal-Wallis-Test bei  $n < 5$ . Ein p-Wert kleiner 0,05 wurde als statistisch signifikant angesehen. Hierbei gilt: \*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ , \*\*\*:  $p < 0,001$ , ns: nicht signifikant.

Für die statistischen Berechnungen wurde die GraphPad Prism 4.03 Software verwendet. Sämtliche Experimente wurden in mindestens zwei unabhängigen Versuchen wiederholt.

## 6 Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
cDNA	complementary DNA
ColI $\alpha$ 1	Kollagen Typ I $\alpha$ 1
ddH <sub>2</sub> O	bidestilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMEM	Dulbecco's modiefied eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxyriobonukleosidtriphosphat
EZM	Extrazelluläre Matrix
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
<i>et al.</i>	et alii (lat.: und andere)
FAP	Fibroblasten aktivierendes Protein
FCM	Fibroblasten konditioniertes Medium
FFPE	Formalin-Fixed Paraffin-Embedded
FGF	Fibroblast Growth Factor
FKS	fötales Kälberserum
g	Gramm
h	Stunden
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperaziny)- Ethansulfonsäure (Puffersubstanz)
IgG	Immunglobulin G
kb	Kilobasenpaare
KCM	Keratinocyten konditioniertes Medium

kDA	Kilodalton
KF	Keloid-Fibroblasten
KGF	Keratinocyte Growth Factor
KGFR	KGF-Rezeptor
l	Liter
LB-Medium	Luria Bertani-Medium
min	Minuten
mRNA	messenger RNA
μ	Mikro (10 <sup>-6</sup> )
NF	normale dermale Fibroblasten
NHDF	normale humane dermale Fibroblasten
NHEK	normale humane epidermale Keratinozyten
NK	normale epidermale Keratinozyten
nm	Nanometer
OSM	Oncostatin M
OSMR	OSM-Rezeptor
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pSTAT3	phosphoryliertes STAT3
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RIPA	Radio-Immunpräzipitationsassay
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Real Time PCR
SDS	Natriumdodecylsulfat
sek	Sekunden
SF	Sklerodermie-Fibroblasten

siRNA	small interference RNA
STAT	Signal transducer and activator of transcription
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBS	Tris-buffered Saline (Puffer)
TBST	TBS mit Tween20
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
TGF- $\beta$	Transforming Growth Factor- $\beta$
U	Unit
uPA	Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator
uPAR	uPA-Rezeptor
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
°C	Grad Celsius

## 7 Literaturverzeichnis

Aden, N., Nuttall, A., Shiwen, X., de Winter, P., Leask, A., Black, C.M., Denton, C.P., Abraham, D.J., and Stratton, R.J. (2010). Epithelial Cells Promote Fibroblast Activation via IL-1[alpha] in Systemic Sclerosis. *J Invest Dermatol*.

Alarmo, E.-L., and Kallioniemi, A. (2010). Bone morphogenetic proteins in breast cancer: dual role in tumourigenesis? *Endocr Relat Cancer* 17, R123–R139.

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walters, P. (2008). *Molecular Biology of the Cell* (Garland Science).

Arnett, F.C., Gourh, P., Shete, S., Ahn, C.W., Honey, R.E., Agarwal, S.K., Tan, F.K., McNearney, T., Fischbach, M., Fritzler, M.J., et al. (2010). Major histocompatibility complex (MHC) class II alleles, haplotypes and epitopes which confer susceptibility or protection in systemic sclerosis: analyses in 1300 Caucasian, African-American and Hispanic cases and 1000 controls. *Ann. Rheum. Dis.* 69, 822–827.

Beaven, A.W., and Shea, T.C. (2006). Palifermin: a keratinocyte growth factor that reduces oral mucositis after stem cell transplant for haematological malignancies. *Expert Opin Pharmacother* 7, 2287–2299.

Bhattacharyya, S., Wei, J., and Varga, J. (2011). Understanding fibrosis in systemic sclerosis: shifting paradigms, emerging opportunities. *Nat Rev Rheumatol* 8, 42–54.

Boilly, B., Vercoutter-Edouart, A.S., Hondermarck, H., Nurcombe, V., and Le Bourhis, X. (2000). FGF signals for cell proliferation and migration through different pathways. *Cytokine Growth Factor Rev.* 11, 295–302.

Boin, F., and Hummers, L.K. (2008). Scleroderma-like fibrosing disorders. *Rheum. Dis. Clin. North Am.* 34, 199–220; ix.

Bran, G.M., Goessler, U.R., Hormann, K., Riedel, F., and Sadick, H. (2009). Keloids: current concepts of pathogenesis (review). *Int. J. Mol. Med.* 24, 283–293.

Brauchle, M., Angermeyer, K., Hübner, G., and Werner, S. (1994). Large induction of keratinocyte growth factor expression by serum growth factors and pro-inflammatory cytokines in cultured fibroblasts. *Oncogene* 9, 3199–3204.

Brown, J.J., Ollier, W.E.R., Thomson, W., and Bayat, A. (2008). Positive association of HLA-DRB1\*15 with keloid disease in Caucasians. *Int. J. Immunogenet.* 35, 303–307.

Butler, P.D., Ly, D.P., Longaker, M.T., and Yang, G.P. (2008). Use of organotypic coculture to study keloid biology. *Am. J. Surg.* 195, 144–148.

Chedid, M., Rubin, J.S., Csaky, K.G., and Aaronson, S.A. (1994). Regulation of keratinocyte growth factor gene expression by interleukin 1. *J. Biol. Chem.* 269, 10753–10757.

Cheng, B., Fu, X., Sun, T., Sun, X., and Sheng, Z. (2002). Expression of epidermal growth factor receptor and related phosphorylation proteins in hypertrophic scars and normal skin. *Chin. Med. J.* 115, 1525–1528.

Clark, S. (2005). Animal models in scleroderma. *Current Rheumatology Reports* 7, 150–155.



- Coulombe, P.A. (2003). Wound epithelialization: accelerating the pace of discovery. *J. Invest. Dermatol.* *121*, 219–230.
- Dang, C.M., Beanes, S.R., Soo, C., Ting, K., Benhaim, P., Hedrick, M.H., and Lorenz, H.P. (2003). Decreased expression of fibroblast and keratinocyte growth factor isoforms and receptors during scarless repair. *Plast. Reconstr. Surg.* *111*, 1969–1979.
- Dauer, D.J., Ferraro, B., Song, L., Yu, B., Mora, L., Buettner, R., Enkemann, S., Jove, R., and Haura, E.B. (2005). Stat3 regulates genes common to both wound healing and cancer. *Oncogene* *24*, 3397–3408.
- Deterding, R.R., Havill, A.M., Yano, T., Middleton, S.C., Jacoby, C.R., Shannon, J.M., Simonet, W.S., and Mason, R.J. (1997). Prevention of bleomycin-induced lung injury in rats by keratinocyte growth factor. *Proc. Assoc. Am. Physicians* *109*, 254–268.
- Dienus, K., Bayat, A., Gilmore, B.F., and Seifert, O. (2010). Increased expression of fibroblast activation protein- $\alpha$  in keloid fibroblasts: implications for development of a novel treatment option. *Arch. Dermatol. Res.* *302*, 725–731.
- Dreuw, A., Hermanns, H.M., Heise, R., Jousen, S., Rodríguez, F., Marquardt, Y., Jugert, F., Merk, H.F., Heinrich, P.C., and Baron, J.M. (2005). Interleukin-6-type cytokines upregulate expression of multidrug resistance-associated proteins in NHEK and dermal fibroblasts. *J. Invest. Dermatol.* *124*, 28–37.
- E S Yi, S.T.W. (1997). Keratinocyte growth factor ameliorates radiation- and bleomycin-induced lung injury and mortality. *The American Journal of Pathology* *149*, 1963–1970.
- Eckes, B., Zigrino, P., Kessler, D., Holtkötter, O., Shephard, P., Mauch, C., and Krieg, T. (2000). Fibroblast-matrix interactions in wound healing and fibrosis. *Matrix Biol.* *19*, 325–332.
- Ferguson, M.W.J., and O’Kane, S. (2004). Scar-free healing: from embryonic mechanisms to adult therapeutic intervention. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* *359*, 839–850.
- Fett, N., and Werth, V.P. (2011). Update on morphea: part I. Epidemiology, clinical presentation, and pathogenesis. *J. Am. Acad. Dermatol.* *64*, 217–228; quiz 229–230.
- Finch, P.W., Rubin, J.S., Miki, T., Ron, D., and Aaronson, S.A. (1989). Human KGF is FGF-related with properties of a paracrine effector of epithelial cell growth. *Science* *245*, 752–755.
- Florin, L., Maas-Szabowski, N., Werner, S., Szabowski, A., and Angel, P. (2005). Increased keratinocyte proliferation by JUN-dependent expression of PTN and SDF-1 in fibroblasts. *J. Cell. Sci.* *118*, 1981–1989.
- Gadina, M., Hilton, D., Johnston, J.A., Morinobu, A., Lighvani, A., Zhou, Y.J., Visconti, R., and O’Shea, J.J. (2001). Signaling by type I and II cytokine receptors: ten years after. *Curr. Opin. Immunol.* *13*, 363–373.
- Ghazizadeh, M., Tosa, M., Shimizu, H., Hyakusoku, H., and Kawanami, O. (2007). Functional implications of the IL-6 signaling pathway in keloid pathogenesis. *J. Invest. Dermatol.* *127*, 98–105.

- Grose, R., and Werner, S. (2004). Wound-healing studies in transgenic and knockout mice. *Mol. Biotechnol* 28, 147–166.
- Grzegorzczak-Jaźwińska, A., Kozak, I., Karakulska-Prystupiak, E., Rokicka, M., Ganowicz, E., Dwilewicz-Trojaczek, J., and Górka, R. (2006). Transient oral cavity and skin complications after mucositis preventing therapy (palifermin) in a patient after allogeneic PBSCT. Case history. *Adv Med Sci* 51 *Suppl* 1, 66–68.
- Guo, L., Degenstein, L., and Fuchs, E. (1996). Keratinocyte growth factor is required for hair development but not for wound healing. *Genes Dev.* 10, 165–175.
- Guo, L., Yu, Q.C., and Fuchs, E. (1993). Targeting expression of keratinocyte growth factor to keratinocytes elicits striking changes in epithelial differentiation in transgenic mice. *EMBO J* 12, 973–986.
- Heinrich, P.C., Behrmann, I., Müller-Newen, G., Schaper, F., and Graeve, L. (1998). Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochem. J.* 334 (Pt 2), 297–314.
- Hillmer, M., Salama, S., and MacLeod, S. (2002). Limitations of studying keloid scars using the nude athymic mouse model. *Can J Plast Surg Vol* 10, 56–61.
- Honda, N., Jinnin, M., Kajihara, I., Makino, T., Makino, K., Masuguchi, S., Fukushima, S., Okamoto, Y., Hasegawa, M., Fujimoto, M., et al. (2012). TGF- $\beta$ -Mediated Downregulation of MicroRNA-196a Contributes to the Constitutive Upregulated Type I Collagen Expression in Scleroderma Dermal Fibroblasts. *J. Immunol.* 188, 3323–3331.
- Huang, C., and Ogawa, R. (2012). Fibroproliferative Disorders and Their Mechanobiology. *Connective Tissue Research*.
- Hwa, C., Bauer, E.A., and Cohen, D.E. (2011). Skin biology. *Dermatol Ther* 24, 464–470.
- Itoh, N. (2007). The Fgf families in humans, mice, and zebrafish: their evolutionary processes and roles in development, metabolism, and disease. *Biol. Pharm. Bull.* 30, 1819–1825.
- Jinnin, M. (2010). Mechanisms of skin fibrosis in systemic sclerosis. *The Journal of Dermatology* 37, 11–25.
- Khan, K., Xu, S., Nihtyanova, S., Derrett-Smith, E., Abraham, D., Denton, C.P., and Ong, V.H. (2012). Clinical and pathological significance of interleukin 6 overexpression in systemic sclerosis. *Ann. Rheum. Dis.* 71, 1235–1242.
- Kischer, C.W., Shetlar, M.R., and Chvapil, M. (1982). Hypertrophic scars and keloids: a review and new concept concerning their origin. *Scan Electron Microsc* 1699–1713.
- Krieg, T., Abraham, D., and Lafyatis, R. (2007). Fibrosis in connective tissue disease: the role of the myofibroblast and fibroblast-epithelial cell interactions. *Arthritis Res. Ther.* 9 *Suppl* 2, S4.
- Kurzinski, K., and Torok, K.S. (2011). Cytokine profiles in localized scleroderma and relationship to clinical features. *Cytokine* 55, 157–164.

- Kwaan, H.C. (1992). The plasminogen-plasmin system in malignancy. *Cancer Metastasis Rev.* 11, 291–311.
- Leake, D., Doerr, T.D., and Scott, G. (2003). Expression of urokinase-type plasminogen activator and its receptor in keloids. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 129, 1334–1338.
- Leitenberger, J.J., Cayce, R.L., Haley, R.W., Adams-Huet, B., Bergstresser, P.R., and Jacobe, H.T. (2009). Distinct autoimmune syndromes in morphea: a review of 245 adult and pediatric cases. *Arch Dermatol* 145, 545–550.
- Lim, C.P., Phan, T.T., Lim, I.J., and Cao, X. (2009). Cytokine profiling and Stat3 phosphorylation in epithelial-mesenchymal interactions between keloid keratinocytes and fibroblasts. *J. Invest. Dermatol.* 129, 851–861.
- Lim, C.P., Phan, T.-T., Lim, I.J., and Cao, X. (2006). Stat3 contributes to keloid pathogenesis via promoting collagen production, cell proliferation and migration. *Oncogene* 25, 5416–5425.
- Lim, I.J., Phan, T.-T., Bay, B.-H., Qi, R., Huynh, H., Tan, W.T.-L., Lee, S.-T., and Longaker, M.T. (2002). Fibroblasts cocultured with keloid keratinocytes: normal fibroblasts secrete collagen in a keloidlike manner. *Am J Physiol Cell Physiol* 283, C212–C222.
- Ma, H.-H., Ziegler, J., Li, C., Sepulveda, A., Bedeir, A., Grandis, J., Lentzsch, S., and Mapara, M.Y. (2011). Sequential activation of inflammatory signaling pathways during graft-versus-host disease (GVHD): early role for STAT1 and STAT3. *Cell. Immunol.* 268, 37–46.
- Maas-Szabowski, N., Shimotoyodome, A., and Fusenig, N.E. (1999). Keratinocyte growth regulation in fibroblast cocultures via a double paracrine mechanism. *J. Cell. Sci.* 112 (*Pt* 12), 1843–1853.
- Madison, K.C. (2003). Barrier function of the skin: “la raison d’être” of the epidermis. *J. Invest. Dermatol.* 121, 231–241.
- Madlener, M., Mauch, C., Conca, W., Brauchle, M., Parks, W.C., and Werner, S. (1996). Regulation of the expression of stromelysin-2 by growth factors in keratinocytes: implications for normal and impaired wound healing. *Biochem J* 320, 659–664.
- Marchand-Adam, S., Plantier, L., Bernuau, D., Legrand, A., Cohen, M., Marchal, J., Soler, P., Lesèche, G., Mal, H., Aubier, M., et al. (2005). Keratinocyte Growth Factor Expression by Fibroblasts in Pulmonary Fibrosis Poor Response to Interleukin-1 $\beta$ . *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 32, 470–477.
- Martin, P. (1997). Wound healing--aiming for perfect skin regeneration. *Science* 276, 75–81.
- Medsger, T.A., Jr (1994). Epidemiology of systemic sclerosis. *Clin. Dermatol.* 12, 207–216.
- Miki, T., Bottaro, D.P., Fleming, T.P., Smith, C.L., Burgess, W.H., Chan, A.M., and Aaronson, S.A. (1992). Determination of ligand-binding specificity by alternative splicing: two distinct growth factor receptors encoded by a single gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 246–250.
- Mir, S.A., Chatterjee, A., Mitra, A., Pathak, K., Mahata, S.K., and Sarkar, S. (2012). Inhibition of Signal Transducer and Activator of Transcription 3 (STAT3) Attenuates Interleukin-6 (IL-6)-

induced Collagen Synthesis and Resultant Hypertrophy in Rat Heart. *J. Biol. Chem.* 287, 2666–2677.

Mozaffarian, A., Brewer, A.W., Trueblood, E.S., Luzina, I.G., Todd, N.W., Atamas, S.P., and Arnett, H.A. (2008). Mechanisms of oncostatin M-induced pulmonary inflammation and fibrosis. *J. Immunol* 181, 7243–7253.

Nicolson, G.L. (1993). Cancer progression and growth: relationship of paracrine and autocrine growth mechanisms to organ preference of metastasis. *Exp. Cell Res.* 204, 171–180.

Niu, J., Chang, Z., Peng, B., Xia, Q., Lu, W., Huang, P., Tsao, M.-S., and Chiao, P.J. (2007). Keratinocyte growth factor/fibroblast growth factor-7-regulated cell migration and invasion through activation of NF-kappaB transcription factors. *J. Biol. Chem* 282, 6001–6011.

Ong, C.T., Khoo, Y.T., Mukhopadhyay, A., Masilamani, J., Do, D.V., Lim, I.J., and Phan, T.T. (2010). Comparative proteomic analysis between normal skin and keloid scar. *Br. J. Dermatol.* 162, 1302–1315.

Pang, M., Ma, L., Gong, R., Tolbert, E., Mao, H., Ponnusamy, M., Chin, Y.E., Yan, H., Dworkin, L.D., and Zhuang, S. (2010). A novel STAT3 inhibitor, S3I-201, attenuates renal interstitial fibroblast activation and interstitial fibrosis in obstructive nephropathy. *Kidney Int.* 78, 257–268.

Papin, J.A., Hunter, T., Palsson, B.O., and Subramaniam, S. (2005). Reconstruction of cellular signalling networks and analysis of their properties. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 99–111.

Park, G., Yoon, B.S., Moon, J.-H., Kim, B., Jun, E.K., Oh, S., Kim, H., Song, H.J., Noh, J.Y., Oh, C., et al. (2008). Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate suppresses collagen production and proliferation in keloid fibroblasts via inhibition of the STAT3-signaling pathway. *J. Invest. Dermatol.* 128, 2429–2441.

Pechkovsky, D.V., Prêle, C.M., Wong, J., Hogaboam, C.M., McAnulty, R.J., Laurent, G.J., Zhang, S.S.-M., Selman, M., Mutsaers, S.E., and Knight, D.A. (2012). STAT3-Mediated Signaling Dysregulates Lung Fibroblast-Myofibroblast Activation and Differentiation in UIP/IPF. *The American Journal of Pathology*.

Phan, T.-T., Lim, I.J., Bay, B.-H., Qi, R., Huynh, H.T., Lee, S.-T., and Longaker, M.T. (2002). Differences in collagen production between normal and keloid-derived fibroblasts in serum-media co-culture with keloid-derived keratinocytes. *Journal of Dermatological Science* 29, 26–34.

Postiglione, L., Montuori, N., Riccio, A., Di Spigna, G., Salzano, S., Rossi, G., and Ragno, P. (2010). The plasminogen activator system in fibroblasts from systemic sclerosis. *Int J Immunopathol Pharmacol* 23, 891–900.

Profyris, C., Tziotzios, C., and Do Vale, I. (2012). Cutaneous scarring: Pathophysiology, molecular mechanisms, and scar reduction therapeutics Part I. The molecular basis of scar formation. *J. Am. Acad. Dermatol.* 66, 1–10; quiz 11–12.

Proksch, E., Brandner, J.M., and Jensen, J.-M. (2008). The skin: an indispensable barrier. *Exp. Dermatol.* 17, 1063–1072.

Sakamoto, S., Yazawa, T., Baba, Y., Sato, H., Kanegae, Y., Hirai, T., Saito, I., Goto, T., and Kurahashi, K. (2011). Keratinocyte growth factor gene transduction ameliorates pulmonary fibrosis induced by bleomycin in mice. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* *45*, 489–497.

Satish, L., Lyons-Weiler, J., Hebda, P.A., and Wells, A. (2006). Gene expression patterns in isolated keloid fibroblasts. *Wound Repair Regen* *14*, 463–470.

Sawicki, G., Marcoux, Y., Sarkhosh, K., Tredget, E.E., and Ghahary, A. (2005). Interaction of keratinocytes and fibroblasts modulates the expression of matrix metalloproteinases-2 and -9 and their inhibitors. *Mol. Cell. Biochem.* *269*, 209–216.

Scaffidi, A.K., Mutsaers, S.E., Moodley, Y.P., McAnulty, R.J., Laurent, G.J., Thompson, P.J., and Knight, D.A. (2002). Oncostatin M stimulates proliferation, induces collagen production and inhibits apoptosis of human lung fibroblasts. *Br J Pharmacol* *136*, 793–801.

Schlessinger, J. (2000). Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* *103*, 211–225.

Scott, J.D., and Pawson, T. (2000). Cell communication: the inside story. *Sci. Am.* *282*, 72–79.

Seifert, O., and Mrowietz, U. (2009). Keloid scarring: bench and bedside. *Arch. Dermatol. Res.*

Selman, M., and Pardo, A. (2002). Idiopathic pulmonary fibrosis: an epithelial/fibroblastic cross-talk disorder. *Respir. Res.* *3*, 3.

Shetlar, M.R., Shetlar, C.L., Hendricks, L., and Kischer, C.W. (1985). The use of athymic nude mice for the study of human keloids. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* *179*, 549–552.

Shibusawa, Y., Negishi, I., Tabata, Y., and Ishikawa, O. (2008). Mouse model of dermal fibrosis induced by one-time injection of bleomycin-poly(L-lactic acid) microspheres. *Rheumatology (Oxford)* *47*, 454–457.

Shih, B., Garside, E., McGrouther, D.A., and Bayat, A. (2010). Molecular dissection of abnormal wound healing processes resulting in keloid disease. *Wound Repair Regen* *18*, 139–153.

Silver, J.S., and Hunter, C.A. (2010). gp130 at the nexus of inflammation, autoimmunity, and cancer. *J. Leukoc. Biol.* *88*, 1145–1156.

Singh, A.B., and Harris, R.C. (2005). Autocrine, paracrine and juxtacrine signaling by EGFR ligands. *Cellular Signalling* *17*, 1183–1193.

Sotiropoulou, P.A., and Blanpain, C. (2012). Development and Homeostasis of the Skin Epidermis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* *4*,

Steiling, H., and Werner, S. (2003). Fibroblast growth factors: key players in epithelial morphogenesis, repair and cytoprotection. *Curr. Opin. Biotechnol.* *14*, 533–537.

Strand, K., Murray, J., Aziz, S., Ishida, A., Rahman, S., Patel, Y., Cardona, C., Hammond, W.P., Savidge, G., and Wijelath, E.S. (2000). Induction of the urokinase plasminogen activator system by oncostatin M promotes endothelial migration. *J. Cell. Biochem.* *79*, 239–248.

Sugahara, K., Iyama, K., Kuroda, M.J., and Sano, K. (1998). Double intratracheal instillation of keratinocyte growth factor prevents bleomycin-induced lung fibrosis in rats. *J. Pathol.* *186*, 90–98.

- Takehara, K., and Sato, S. (2005). Localized scleroderma is an autoimmune disorder. *Rheumatology (Oxford)* *44*, 274–279.
- Tickle, C. (2006). Making digit patterns in the vertebrate limb. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *7*, 45–53.
- Tomimura, S., Ogawa, F., Iwata, Y., Komura, K., Hara, T., Muroi, E., Takenaka, M., Shimizu, K., Hasegawa, M., Fujimoto, M., et al. (2008). Autoantibodies against matrix metalloproteinase-1 in patients with localized scleroderma. *J. Dermatol. Sci.* *52*, 47–54.
- Tucker, T.A., Williams, L., Koenig, K., Kothari, H., Komissarov, A.A., Florova, G., Mazar, A.P., Allen, T.C., Bdeir, K., Mohan Rao, L.V., et al. (2012). Lipoprotein Receptor–Related Protein 1 Regulates Collagen 1 Expression, Proteolysis, and Migration in Human Pleural Mesothelial Cells. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* *46*, 196–206.
- Ulrich, D., Ulrich, F., Unglaub, F., Piatkowski, A., and Pallua, N. (2010). Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in patients with different types of scars and keloids. *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery* *63*, 1015–1021.
- Verhaegen, P.D.H.M., Van Zuijlen, P.P.M., Pennings, N.M., Van Marle, J., Niessen, F.B., Van Der Horst, C.M.A.M., and Middelkoop, E. (2009). Differences in collagen architecture between keloid, hypertrophic scar, normotrophic scar, and normal skin: An objective histopathological analysis. *Wound Repair and Regeneration* *17*, 649–656.
- Viera, M.H., Amini, S., Valins, W., and Berman, B. (2010). Innovative Therapies in the Treatment of Keloids and Hypertrophic Scars. *J Clin Aesthet Dermatol* *3*, 20–26.
- Werner, S. (1998). Keratinocyte growth factor: a unique player in epithelial repair processes. *Cytokine Growth Factor Rev.* *9*, 153–165.
- Werner, S., and Grose, R. (2003). Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol. Rev.* *83*, 835–870.
- Werner, S., Krieg, T., and Smola, H. (2007). Keratinocyte-fibroblast interactions in wound healing. *J. Invest. Dermatol.* *127*, 998–1008.
- Werner, S., Smola, H., Liao, X., Longaker, M.T., Krieg, T., Hofschneider, P.H., and Williams, L.T. (1994). The function of KGF in morphogenesis of epithelium and reepithelialization of wounds. *Science* *266*, 819–822.
- Wynn, T.A. (2007). Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases. *J. Clin. Invest* *117*, 524–529.
- Yosipovitch, G., DeVore, A., and Dawn, A. (2007). Obesity and the skin: skin physiology and skin manifestations of obesity. *J. Am. Acad. Dermatol.* *56*, 901–916; quiz 917–920.
- Young-Min, S.A., Beeton, C., Loughton, R., Plumpton, T., Bartram, S., Murphy, G., Black, C., and Cawston, T.E. (2001). Serum TIMP-1, TIMP-2, and MMP-1 in patients with systemic sclerosis, primary Raynaud’s phenomenon, and in normal controls. *Ann. Rheum. Dis.* *60*, 846–851.
- Zimmerman, G.A., Lorant, D.E., McIntyre, T.M., and Prescott, S.M. (1993). Juxtacrine intercellular signaling: another way to do it. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* *9*, 573–577.

Zimonjic, D.B., Kelley, M.J., Rubin, J.S., Aaronson, S.A., and Popescu, N.C. (1997). Fluorescence in situ hybridization analysis of keratinocyte growth factor gene amplification and dispersion in evolution of great apes and humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *94*, 11461–11465.

## 8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Schematische Darstellung eines Querschnitts durch die humane Haut.....	4
Abbildung 2. Schematische Darstellung des generellen Prinzips der Signaltransduktion. ....	9
Abbildung 3. Schematische Darstellung der KGF-Signaltransduktion.....	12
Abbildung 4. Patient mit mehreren keloidalen Narben im Schulterbereich.....	14
Abbildung 5. Patientin mit systemischer Sklerodermie. ....	16
Abbildung 6. Patientin mit zirkumskripter Sklerodermie.....	17
Abbildung 7. KGF-mRNA Expression in Keloid- und Sklerodermie Fibroblasten im Vergleich zu normalen Fibroblasten. ....	21
Abbildung 8. KGF-Protein-Konzentration in den Fibroblasten-Überständen. ....	22
Abbildung 9. KGF-Protein Mengen in den-Seren von Keloid- und Sklerodermie-Patienten im Vergleich zu gesunden Spendern. ....	22
Abbildung 10. KGF-Expression in gesundem und erkranktem Gewebe.....	23
Abbildung 11. KGF-IHC in normaler Dermis und Keloid- bzw. Sklerodermie-Dermis. ....	23
Abbildung 12. Kollagen Typ I $\alpha 1$ und FAP mRNA Expression in FFPE-Gewebe.....	24
Abbildung 13. Expression des KGF-Rezeptors. ....	25
Abbildung 14. Experimenteller Aufbau zur Analyse der potentiellen doppelt-parakrinen Wirkung von KGF.....	25
Abbildung 15. Kollagen Typ I $\alpha 1$ und FAP mRNA Expression in NF mit KCM .....	26
Abbildung 16. Fibroblasten-Migration bei Inkubation mit KCM.....	27
Abbildung 17. Doppelt parakriner Einfluss von KGF auf die Fibroblasten-Aktivität.....	28
Abbildung 18. Einfluss eines Knockdowns der KGF-Expression auf die Fibroblasten- Aktivität. ....	29
Abbildung 19. OSM mRNA Expression in Keratinozyten nach KGF- bzw. FCM- Behandlung. ....	31
Abbildung 20. OSM Protein-Menge in Keratinozyten-Überständen nach KGF- bzw. FCM- Behandlung. ....	32
Abbildung 21. Direkte Effekte von rekombinantem OSM auf die Fibroblasten-Aktivität. ....	33
Abbildung 22. OSM mRNA Expression in Keratinozyten nach KGF Behandlung bei simultanem KGFR-Knockdown. ....	34
Abbildung 23. OSM mRNA Expression in Keratinozyten nach Behandlung mit FCM bei simultaner KGF-Inhibition. ....	34
Abbildung 24. Expression von OSM in gesundem und erkranktem Gewebe.....	35
Abbildung 25. STAT3-Phosphorylierung in Fibroblasten nach OSM- bzw. KCM- Behandlung. ....	36
Abbildung 26. STAT3/pSTAT3-WB mit direkt FCM-behandelten Fibroblasten.....	36
Abbildung 27. STAT3-Aktivierbarkeit in normalen und Keloid- zw. Sklerodermie- Fibroblasten. ....	37



Abbildung 28. Indirekte Abhängigkeit der STAT3-Aktivierbarkeit von KGF.....	38
Abbildung 29. Direkte Abhängigkeit der STAT3-Phosphorylierung von OSM. ....	38
Abbildung 30. Abhängigkeit der Kollagen Typ I $\alpha$ 1-Expression und der Fibroblasten-Migration von der STAT3-Aktivierung. ....	39
Abbildung 31. Expression von uPA mRNA nach OSM-Behandlung in normalen und Keloid- bzw. Sklerodermie-Fibroblasten.....	40
Abbildung 32. Abhängigkeit der uPA-Expression von der STAT3-Aktivierung in Fibroblasten. ....	41
Abbildung 33. uPA mRNA Expression in Fibroblasten nach OSM- und KCM-Behandlung.....	41
Abbildung 34. Abhängigkeit der OSM-induzierten Fibroblasten-Migration von uPA.....	42
Abbildung 35. Expression von uPA mRNA Expression in FFPE-Gewebe.....	42
Abbildung 36. Expression von OSM, FAP, Kollagen TypI $\alpha$ 1 und uPA in humaner Haut nach Behandlung mit rekombinantem KGF. ....	43
Abbildung 37. Vereinfachte Darstellung der untersuchten doppeltparakrinen Signalschleife und therapeutische Eingriffsmöglichkeiten.....	50

## 9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. Vergleich von Keloid und systemischer und zirkumskripter Sklerodermie. ....	18
Tabelle 2. Expressionsverhältnisse verschiedener Faktoren in KGF-behandelten Keratinocyten im Vergleich zu Unbehandelten. ....	30

## **Eigene Publikationen**

**Johanna Canady**, Stephanie Arndt, Sigrid Karrer und Anja-Katrin Bosserhoff, Journal of Investigative Dermatology (JID): Increased expression of KGF promotes fibroblast activation in a double paracrine manner resulting in cutaneous fibrosis. Akzeptiert August 2012.

**Johanna Canady**, Sigrid Karrer und Anja-Katrin Bosserhoff, Review: Fibrosing connective tissue disorders of the skin: molecular similarities and distinctions. Submitted.

Stephanie Arndt, Sigrid Karrer, **Johanna Schmidt** und Anja-Katrin Bosserhoff, American Journal of Pathology (AJP): Fussel-15 is a modulator of wound healing and is deregulated in keloid and skin sclerosis. Februar 2011

## **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich bei den vielen Menschen bedanken, die mich durch die Zeit meiner Doktorarbeit begleitet und mich unterstützt haben.

Einen großen Dank möchte ich Frau Prof. Dr. Anja Boßerhoff aussprechen für die Betreuung dieser Arbeit, für Deine Hartnäckigkeit und Deinen Glauben an den Durchbruch.

Bei Herrn Prof. Dr. Ferdinand Hofstädter möchte ich mich bedanken für die Gelegenheit an seinem Institut zu promovieren.

Ein herzlicher Dank gilt auch meinen beiden Mentoren: Prof. Dr. Sigrid Karrer für die Diskussionsbereitschaft bei medizinischen Fragen und die praktische Unterstützung und Prof. Dr. Rainer Deutzmann für seine Spontaneität und sein Engagement.

Vielen Dank an Rudi Jung für die Bemühungen mit den KGF-Antikörpern und an den Derma-OP für die vielen Hautstückchen.

Liebe Arbeitsgruppe, die letzten vier Jahre waren in vielerlei Hinsicht eine große Herausforderung und ich möchte mich bei euch bedanken für alles was ich in dieser Zeit gelernt habe. Jede und jeder von euch hat dazu etwas beigetragen. Liebste Susanni, danke für Deinen Mut, Deinen Trost und Deine Freundschaft. Ein herzliches Dankeschön an Änki (und Tänki) für mehr Spaß in Ober-I. Simone und Sibülla, vielen Dank für eure ansteckende Power. Herzlichen Dank an die Spice Girls (Lena, Mona, Miri und Corinna) für den erfrischenden Wind, den ihr in die Gruppe gebracht habt. Danke Daniel für Gyrokooper und Geo-Caching. Lieben Dank an Kathi, Melli, Lisa, Chrissie, Matthias und den Rest der Brezn-Crew für den Zusammenhalt im Arbeitsalltag und die fröhlichen Zeiten im Kaffeeraum. Jenny und Braigi, danke für die guten alten Zeiten. Vielen Dank an Andrea für die guten Gespräche. Danke an Steffi für Dein offenes Ohr und Deine Korrekturen. Und ein Riesen-Dankeschön an Alex für Deine unglaubliche Hilfsbereitschaft, Dein lautes Lachen und die Unmengen an Schokolade ☺

Von ganzem Herzen möchte ich mich bei meiner großen geliebten Familie bedanken für euren Rückhalt und euren unerschütterlichen Glauben an mich.

Zuletzt möchte ich meinem wundervollen Mann Daryl danken. Danke danke danke für das große Glück und die Kraft, die Du mir schenkst. Omnia vincit amor.

## **Erklärung**

Ich, Johanna Canady, geboren am 28.12.1983 in Dachau erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen.

Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar Geld oder geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Regensburg, Oktober 2012

.....

Johanna Canady